



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

“Inhibidores de alfa-glucosidasas de *Ageratina grandifolia* (Regel) R.M. King  
& H. Rob (Asteraceae)”

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. JOSÉ ALBERTO GUTIÉRREZ GONZÁLEZ

TUTORA:

DRA. RACHEL MATA ESSAYAG  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, ENERO 2021



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** Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas

**VOCAL** Dra. Laura Patricia Álvarez Berber

**VOCAL** Dr. José Ignacio Regla Contreras

**VOCAL** Dr. Adolfo Andrade Cetto

**SECRETARIO** Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

### **Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:**

Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia,  
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Químicas por el apoyo brindado para continuar con mi preparación académica y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca brindada para realizar los estudios de maestría (No. de becario 867180).

Al CONACYT y a DGAPA-UNAM por el financiamiento otorgado a través de los proyectos CONACYT A1-5-11226 y DGAPA-PAPIIT-IN217

A la Dra. Rachel Mata Essayag, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, y desarrollar este trabajo; por todas las valiosas enseñanzas y consejos y por ser una inspiración para mí. Muchas gracias.

A la Dra. Araceli Pérez Vásquez y a la Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz por su asesoría técnica, por el tiempo y el apoyo brindados durante el proyecto.

Al personal de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química: a la Q. Georgina Duarte Lisci, por su apoyo en la realización de los análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, a la Q. Marisela Gutiérrez Franco por los análisis de infrarrojo, a las M. en C. Rosa Isela del Villar Morales y Nayeli López Balbiaux por el registro de los espectros de RMN.

Al M. en C. Rafael Torres Colín, del Instituto de Biología, UNAM, por la identificación botánica del material vegetal.

Al Dr. Manuel Rangel Grimaldo por su ayuda con la realización de los cálculos computacionales y los estudios de docking y a la M. en C. Daniela Rebollar Ramos por su apoyo con las evaluaciones enzimáticas.

A los miembros del jurado asignado, por sus valiosas observaciones que enriquecieron y permitieron mejorar el contenido de esta tesis.

# **DEDICATORIAS**

# CONTENIDO

<b>Lista de figuras</b> .....	<b>7</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>8</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>8</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>10</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>12</b>
<b>1. Antecedentes</b> .....	<b>13</b>
1.1 Diabetes mellitus .....	13
1.1.1 La pandemia del siglo XXI: un reto para México.....	13
1.1.2 Clasificación de diabetes.....	15
1.1.3 Tratamientos para la DMT2 .....	17
1.1.3.1 El papel de las plantas medicinales para el tratamiento para la DMT2 ...	21
1.2 Enzimas $\alpha$ -glucosidasas .....	21
1.2.1 Inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas .....	23
1.3 Generalidades sobre el género <i>Ageratina</i> .....	25
1.3.1 Aspectos taxonómicos y distribución geográfica .....	25
1.3.2 Química del género .....	26
1.3.3 Usos tradicionales y actividad farmacológica .....	36
1.3.4 Generalidades sobre la especie <i>Ageratina grandifolia</i> .....	37
<b>2. Justificación</b> .....	<b>39</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>40</b>
<b>4. Hipótesis</b> .....	<b>40</b>
<b>5. Parte experimental</b> .....	<b>41</b>
5.1 Material vegetal .....	41
5.2 Obtención de la infusión de <i>A. grandifolia</i> .....	41
5.3 Aislamiento de metabolitos secundarios de <i>A. grandifolia</i> .....	41
5.3.1 Obtención de las fracciones orgánicas de la infusión .....	41
5.3.2 Aislamiento de los metabolitos secundarios de la fracción de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	41

5.3.3 Aislamiento de los metabolitos secundarios de la fracción de AcOEt .....	44
5.3.4 Aislamiento de los metabolitos secundarios de las fracciones 26-32 .....	45
5.4 Cálculos computacionales .....	46
5.5 Aislamiento del aceite esencial .....	46
5.5.1 Aislamiento del compuesto <b>26</b> a partir del aceite esencial .....	47
5.6 Instrumentación y condiciones cromatográficas para el análisis del aceite esencial .....	47
5.7 Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima $\alpha$ -glucosidasa .....	47
5.8 Cinética enzimática de <b>106</b> .....	48
5.9 Estudios de acoplamiento molecular .....	49
<b>6. Resultados y discusión</b> .....	<b>51</b>
6.1 Caracterización de los cromenos <b>23-26</b> y <b>32</b> .....	53
6.2 Caracterización de los flavonoides <b>105-107</b> .....	54
6.3 Caracterización de la <i>p</i> -hidroxiacetofenona <b>108</b> .....	55
6.4 Composición química del aceite esencial .....	62
6.5 Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima $\alpha$ -glucosidasa de <i>S. cerevisiae</i> .....	65
6.6 Cinética enzimática .....	66
6.7 Estudios de acoplamiento molecular .....	67
<b>7. Conclusiones</b> .....	<b>70</b>
<b>8. Perspectivas</b> .....	<b>71</b>
<b>9. Referencias</b> .....	<b>72</b>
<b>10. Anexos</b> .....	<b>82</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cantidad total calculada de adultos (de entre 20 y 79 años) con diabetes en 2019 (FID, 2019) .....	<b>14</b>
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de acción de los distintos fármacos antidiabéticos (Bermejo <i>et al.</i> , 2017) .....	<b>18</b>
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de hidrólisis enzimática de enlaces glucosídicos. a) Retención de la configuración. b) Inversión de la configuración (Davies y Henrissat, 1995) .....	<b>22</b>
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de acción de los inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas en el borde en cepillo de los enterocitos intestinales (Krentz y Bailey, 2005) .....	<b>24</b>
<b>Figura 5.</b> Distribución del género <i>Ageratina</i> . Imagen modificada de Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2020) .....	<b>25</b>
<b>Figura 6.</b> <i>Ageratina grandifolia</i> . A. Rama con puntos oscuros (Hinojosa-Espinosa <i>et al.</i> , 2019). B. Flores (tomado por A. Gutiérrez). C. Hoja ovada-deltaoide, con base serrada decurrente (tomado por A. Vásquez). D. <i>A. grandifolia</i> creciendo en Capulálpam de Méndez, Oaxaca (tomado por A. Vásquez) .....	<b>38</b>
<b>Figura 7.</b> Estructura base de 2,2-dimetil-2 <i>H</i> -cromeno .....	<b>53</b>
<b>Figura 8.</b> Estructura parcial 'a' con correlaciones HMBC .....	<b>55</b>
<b>Figura 9.</b> Estructuras parciales 'b' y 'c' con correlaciones HMBC y COSY .....	<b>56</b>
<b>Figura 10.</b> Estructura 'd' .....	<b>57</b>
<b>Figura 11.</b> Estructura de <b>108</b> con su estereoquímica .....	<b>58</b>
<b>Figura 12.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de <b>108</b> .....	<b>59</b>
<b>Figura 13.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de <b>108</b> .....	<b>59</b>
<b>Figura 14.</b> Formación del heterociclo para los cromenos y benzofuranos a partir de <i>p</i> -hidroxiacetofenona (Castañeda, 1998) .....	<b>61</b>
<b>Figura 15.</b> Metabolitos intermediarios en la formación de cromenos y benzofuranos en Asteraceae (Proksch, 198).....	<b>62</b>
<b>Figura 16.</b> Cromatografía en capa fina de izquierda a derecha de los repartos de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , AcOEt, aceite esencial de <i>A. grandifolia</i> . A) Revelado con anisaldehído. B) UV a 254 nm. Sistema de elución hexano/tolueno/AcOEt (5:4:1) .....	<b>63</b>
<b>Figura 17.</b> Cromatograma iónico total del aceite esencial de <i>A. grandifolia</i> analizado por CG-EM. <b>64</b>	
<b>Figura 18.</b> Curva concentración-respuesta de a) <b>106</b> y b) <b>107</b> sobre la enzima $\alpha$ -glucosidasa de <i>S. cerevisiae</i> .....	<b>66</b>

<b>Figura 19.</b> Gráfico de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa de <i>S. cerevisiae</i> a diferentes concentraciones de <b>106</b> .....	<b>66</b>
<b>Figura 20.</b> A. Modelo estructural de los complejos formados entre la $\alpha$ -glucosidasa de <i>S. cerevisiae</i> con <b>106</b> (verde), <b>107</b> (rojo) y acarbosa (amarillo). Representación 3D de los sitios de unión entre B. <b>106</b> C. <b>107</b> y D. Acarbosa .....	<b>68</b>
<b>Figura 21.</b> Aminoácidos involucrados en la unión de a) <b>106</b> y b) <b>107</b> con la enzima $\alpha$ -glucosidasa de <i>S. cerevisiae</i> .....	<b>69</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación etiológica de diabetes mellitus (ADA, 2014) .....	<b>15</b>
<b>Tabla 2.</b> Agentes antidiabéticos y su mecanismo de acción (Kerru <i>et al.</i> , 2018) .....	<b>20</b>
<b>Tabla 3.</b> Reunión de fracciones de la columna de la fracción de $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .....	<b>42</b>
<b>Tabla 4.</b> Reunión de fracciones de la columna de la fracción de AcOEt.....	<b>43</b>
<b>Tabla 5.</b> Reunión de fracciones de la columna de las fracciones 26-32 de la fracción de AcOEt	<b>45</b>
<b>Tabla 6.</b> Compuestos aislados a partir de <i>A. grandifolia</i> .....	<b>52</b>
<b>Tabla 7.</b> Resultados del análisis de probabilidad DP4+ con diferentes niveles de teoría y con el análisis <i>J</i> -DP4 .....	<b>58</b>
<b>Tabla 8.</b> Datos de RMN de <b>108</b> en $\text{CDCl}_3$ ( $^1\text{H}$ 400 MHz, $^{13}\text{C}$ , 100 MHz).....	<b>60</b>
<b>Tabla 9.</b> Compuestos volátiles identificados por CG-EM a partir del aceite esencial de <i>A. grandifolia</i> .....	<b>64</b>
<b>Tabla 10.</b> Resultados obtenidos de la evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima $\alpha$ -glucosidasa de <i>S. cerevisiae</i> .....	<b>65</b>

## ABREVIATURAS

AcOEt	acetato de etilo
$^{\circ}\text{C}$	grado centígrado
CCA	cromatografía en columna abierta
CCF	cromatografía de capa fina
CG-EM	cromatografía de gases
$\text{CDCl}_3$	cloroformo deuterado
$\text{CD}_3\text{OD}$	metanol deuterado

CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	cloruro de metileno
d	doblete
dd	doble de dobles
ddd	doble de doble de dobles
dq	doble de cuartetos
DMT1	diabetes mellitus tipo I
DMT2	diabetes mellitus tipo II
EM	espectrometría de masas
EM-ESI	espectrometría de masas de ionización por electro-spray
EM-IE	espectrometría de masas por impacto electrónico
g	Gramo
H	hidrógeno
Hz	Hertz
IDH	índice de insaturación
IR	infrarrojo
J	constante de acoplamiento
L	litro
m	multiplete
m/z	relación masa/carga
M	Mega
MeOH	metanol
mg	Miligramo
min	minuto
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfato de sodio
p	pentuplete
q	cuadruplete
qd	cuarteto de dobles
RMN- <sup>1</sup> H	resonancia magnética nuclear de protón
RMN- <sup>13</sup> C	resonancia magnética nuclear de carbono 13
s	Singulete
SBF	Solución amortiguadora de fosfatos
t	triplete
U	Unidades
δ	desplazamiento

## RESUMEN

El presente trabajo describe la búsqueda de inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas de la especie vegetal *Ageratina grandifolia* (Regel) R.M. King & H. Rob (Asteraceae), recolectada en Capulálpam de Méndez, Oaxaca. Esta especie fue seleccionada para su estudio con base en un criterio quimiotaxonómico.

El estudio químico de la infusión de las partes aéreas de *A. grandifolia* condujo al aislamiento de cuatro cromenos: desmetoxiencalina, encalina, encalinalol y *O*-metilencalinalol; 3 flavonoides: quercetagetina-7-*O*- $\beta$ -D-glucósido, quercetagetina-7-*O*-(6-*O*-cafeoil- $\beta$ -D-glucopiranosido), 6-hidroxiempferol-7-*O*-(6-*O*-cafeoil- $\beta$ -D-glucopiranosido), una *p*-hidroxiacetofenona caracterizada como 4-hidroxi-3-((*S*)-1'angeloiloxi-(*R*)-2',3'-epoxi-3'-metil)butil-acetofenona. Este producto es una nueva entidad química. La importancia del aislamiento de este metabolito radica en la biogénesis de los 2,2-dimetilcromenos y 2-isopropenilbenzofuranos, ya que proporciona evidencia sobre la participación de un epóxido intermediario para la formación del anillo heterocíclico de ambos tipos de productos mediante una ciclación oxidativa. Este producto es el primer epóxido de *p*-hidroxiacetofenona prenilada que se aísla, y podría sustentar la hipótesis inicialmente propuesta por varios autores.

El análisis de los componentes volátiles del aceite esencial se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los resultados mostraron que los componentes mayoritarios son desmetoxiencalina, encalinalol,  $\beta$ -eudesmol y *o*-cimeno. Estos representan el 54.6% del contenido total. A partir del aceite esencial fue aislado un cromeno adicional: el androencalinalol.

Se realizaron las evaluaciones biológicas *in vitro* de los compuestos aislados para determinar su actividad como inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Todos los compuestos evaluados presentaron una actividad equiparable a la del control positivo, la acarbosa ( $300 \pm 4 \mu\text{M}$ ), a excepción de los flavonoides quercetagetina-7-*O*-(6-*O*-cafeoil- $\beta$ -D-glucopiranosido) (**106**,  $0.79 \pm 0.006 \mu\text{M}$ ) y 6-hidroxiempferol-7-*O*-(6-*O*-cafeoil- $\beta$ -D-glucopiranosido) (**107**,  $6.957 \pm 0.063 \mu\text{M}$ ), que presentaron una actividad mucho mayor. Los estudios de cinética enzimática arrojaron que el tipo de inhibición del flavonoide **106** es de tipo mixto.

Finalmente, para complementar la actividad biológica observada, se realizaron los estudios de acoplamiento molecular de los metabolitos más activos con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *S.*

*cerevisiae* (PDB: 3A4A). Estos estudios arrojaron que los compuestos se unen preferentemente en el sitio catalítico.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación contribuyen al conocimiento del género *Ageratina* y al estudio químico de *A. grandifolia* y demuestran el valor de esta especie como una fuente de posibles inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas, que representan una alternativa para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II.

## ABSTRACT

The present work describes the search for  $\alpha$ -glucosidases inhibitors from *Ageratina grandifolia* (Regel) R.M. King & H. Rob (Asteraceae), collected on Capulálpam de Méndez, Oaxaca. This species was selected based on a chemotaxonomic criterion.

The chemical study of the infusion of the aerial parts of *A. grandifolia* led to the isolation of four chromenes: desmethoxyencecalin, encecalin, encecalinol and *O*-methylencecalinol; three flavonoids: quercetagetin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside, quercetagetin-7-*O*-(6-*O*-caffeoyl- $\beta$ -D-glucopyranoside), 6-hydroxykaempferol-7-*O*-(6-*O*-caffeoyl- $\beta$ -D-glucopyranoside), and a *p*-hydroxyacetophenone, characterized as 4-hydroxy-3-((*S*)-1'angeloyloxy-(*R*)-2',3'-epoxy-3'-methyl)buthylacetophenone. The latter product is a new chemical entity and its finding in a plant that synthesizes 2,2-dimethylchromenes could be biogenetically relevant. This relevance arose from the fact that this is the first isolation of a prenylated *p*-hydroxyacetophenone epoxide which upon an oxidative cyclization could yield 2,2-dimethylchromenes.

The analysis of the volatile components of the essential oil prepared by hydrodistillation of the dried plant was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The results showed that the major components are desmethoxyencecalin, encecalin,  $\beta$ -eudesmol and *o*-cimene, which together, represent the 54.6% of the total content. An additional chromene, androencecalinol, was isolated from the essential oil.

*In vitro* testing of the isolates against *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -glucosidase enzyme revealed a few active compounds. The flavonoids quercetagetin-7-*O*-(6-*O*-caffeoyl- $\beta$ -D-glucopyranoside) (**106**,  $IC_{50} = 0.79 \pm 0.006 \mu\text{M}$ ) and 6-hydroxykaempferol-7-*O*-(6-*O*-caffeoyl- $\beta$ -D-glucopyranoside) (**107**,  $IC_{50} = 6.957 \pm 0.063 \mu\text{M}$ ), showed higher inhibitory activity than acarbose ( $IC_{50} = 300 \pm 4 \mu\text{M}$ ), the positive control. Kinetic analysis revealed that **106** is a mixed Type of inhibitor. Docking studies performed with performed with  $\alpha$ -glucosidase of *S. cerevisiae* (PDB: 3A4A) predicted that **106** binds preferably on the catalytic site.

The results obtained on this investigation contribute to the knowledge of the genus *Ageratina*, and the chemistry of *A. grandifolia*, and proved the value of this species as a source of possible inhibitors of the  $\alpha$ -glucosidase enzymes, which represents an alternative for the treatment of type 2 diabetes.

# 1. ANTECEDENTES

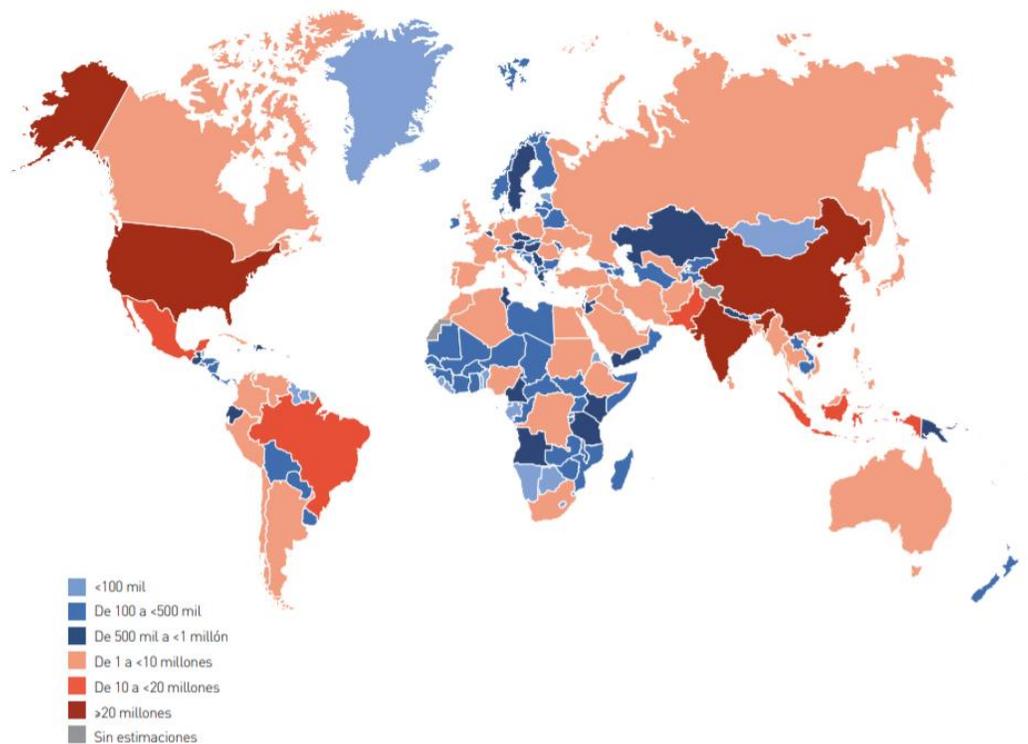
## 1.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus, o simplemente diabetes, es un desorden metabólico complejo caracterizado por altos niveles de glucosa en la sangre (hiperglucemia), resultado de fallas en la secreción de la insulina, su acción, o ambos (Kharroubi y Darwish, 2015). La insulina es una hormona secretada por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans en el páncreas, mantiene normales los niveles de glucosa en sangre facilitando su captación celular y regula el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Wilcox, 2005). Las alteraciones en el funcionamiento de la insulina provocan el estado de hiperglucemia, conduciendo a daños a largo plazo en distintos órganos del cuerpo, mismas que provocan enfermedades cardiovasculares, neuropatía, nefropatía o enfermedades oculares como retinopatía y ceguera. Si no existe un control y tratamiento de la enfermedad, ésta puede derivar en coma diabético y la muerte, debido a una cetoacidosis o menos frecuentemente debido al síndrome hiperosmolar no cetósico (FID, 2019; Kharroubi y Darwish, 2015).

### 1.1.1 La pandemia del siglo XXI: un reto para México

La diabetes es un problema mundial en aumento y es una de las mayores emergencias sanitarias mundiales del siglo XXI. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, en 2019 existían alrededor de 463 millones de casos de diabetes en todo el mundo. En caso de no tomar las medidas necesarias para abordar esta pandemia, se pronostica que al menos 578 millones de personas tendrán diabetes. Para el año 2045, esa cifra aumentará hasta la alarmante cantidad de 700 millones. Este padecimiento se encuentra entre las 10 principales causas de muerte a nivel mundial, y se calcula que, aproximadamente 4 millones de personas entre 20 y 79 años murieron de diabetes en 2019, lo que equivale a un fallecimiento cada ocho segundos. La diabetes es responsable del 10.7% de la mortalidad mundial por cualquier causa en ese grupo de edad (FID, 2019).

De acuerdo con los datos de la FID, los 10 países con mayor número de casos son China, India, Estados Unidos, Pakistán, Brasil, México, Indonesia, Alemania, Egipto y Bangladesh.



**Figura 1.** Cantidad total calculada de adultos (de entre 20 y 79 años) con diabetes en 2019 (Imagen modificada de FID, 2019).

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018, mostró un aumento en la frecuencia de casos de diabetes mellitus en México, pasando de 6.4 millones de personas en 2012 a 8.6 millones en el 2018, siendo las entidades con mayor número de casos Campeche, Tamaulipas, Hidalgo, CDMX y Nuevo León. En lo que respecta a las muertes causadas por diabetes, según datos del INEGI, en 2017 se presentaron 106, 525 casos en total, lo que significa la segunda causa de muertes en el país, representando un 15.2% del total. Además, en 2019, este padecimiento supuso un gasto de 17 mil millones de dólares en el país (FID, 2019).

México se encuentra en medio de una transición epidemiológica: en dos décadas, el perfil de enfermedades en el país ha cambiado de malnutrición, enfermedades transmisibles y enfermedades parasitarias a una nación dominada por la obesidad, diabetes y otras enfermedades relacionadas con la nutrición (Barquera, 2013). Al igual que otros países, México enfrenta diversos problemas que limitan la eficacia en la contención de la diabetes. Destacan por su importancia el desabasto de medicamentos, equipo inadecuado y obsoleto en las unidades de salud, la inaccesibilidad a exámenes de laboratorio, deficiencias en el sistema de referencia de pacientes, limitaciones de los servicios de apoyo psicológico y nutricional, nula promoción de actividad física, automonitoreo de

los niveles de glucosa, y escasa supervisión de los servicios para alcanzar la adherencia terapéutica (SSA, 2010). Los altos costos en salud, y el comportamiento demográfico de México, añadirán riesgos para la población adulta, e incrementarán la demanda de servicios de salud en el futuro cercano. En este contexto, la diabetes y sus complicaciones son un reto económico para cualquier sistema de salud (Arredondo, 2013).

### 1.1.2 Clasificación de diabetes

Aunque la clasificación de los tipos de diabetes tiene fuertes implicaciones en las estrategias a seguir para un tratamiento, éste ha sido un tema complejo y fuente de muchos debates y revisiones a lo largo de muchas décadas. La clasificación más aceptada de diabetes como Tipo I, Tipo II, otros tipos y diabetes mellitus gestacional fue propuesta por la Asociación Americana de Diabetes (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Clasificación etiológica de diabetes mellitus (ADA, 2014)

I.	Diabetes tipo I
	a) Mediada por sistema inmune
	b) Idiopática
II.	Diabetes tipo II
III.	Otros tipos específicos
	a) Defectos genéticos de la función de las células beta
	b) Defectos genéticos en la acción de la insulina
	c) Enfermedades del páncreas
	d) Endocrinopatías
	e) Inducida por fármacos o químicos.
	f) Infecciones
	g) Formas no comunes de diabetes mediada por el sistema inmune
	h) Otros síndromes no comunes asociados con diabetes
IV.	Diabetes mellitus gestacional

La diabetes mellitus tipo I (DMT1) está causada por una reacción autoinmune en la cual el sistema inmunitario del organismo ataca a las células beta del páncreas que producen la insulina mediante una respuesta inflamatoria mediada por células T (insulitis), así como una respuesta humoral (células beta). Como consecuencia, el cuerpo no produce insulina o la cantidad que produce no es suficiente. Aunque no están claras las causas de este proceso destructivo, se cree que la reacción autoinmune se origina a raíz de la combinación de una sensibilidad genética (mutaciones en

algunos genes) y desencadenantes ambientales, como una infección viral, algunas toxinas o factores nutricionales. La DMT1 se presenta de manera más común en niños y adolescentes, representando del 80% al 90% de casos en este sector poblacional (FID, 2019; Kharroubi y Darwish, 2015).

Dentro de los síntomas de la DMT1 se encuentran el aumento de la frecuencia urinaria (poliuria), sed excesiva (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso inexplicable, entumecimiento de las extremidades, dolores (disestesias) de los pies, fatiga, visión borrosa, pérdida de la conciencia, náuseas y vómitos intensos o estado de coma; además es más común la cetoacidosis en el tipo I que en el tipo II (OMS, 2020).

La diabetes mellitus tipo II (DMT2) es el tipo más común de diabetes y representa cerca del 90% de los casos en todo el mundo. En principio, la hiperglucemia en la DMT2 es resultado de la incapacidad de las células del cuerpo de responder totalmente a la insulina, lo que se conoce como “resistencia a la insulina”. Durante el estado de resistencia a la insulina, la hormona no es eficaz, lo que deriva en un aumento de su producción; con el tiempo, se puede llegar a una elaboración de insulina inadecuada por que las células beta pancreáticas no cumplen con la demanda (FID, 2019).

Aunque todavía no se comprenden completamente las causas de la DMT2, la aparición de esta enfermedad se encuentra ligada a una combinación de factores genéticos, obesidad, poca actividad física y una alimentación malsana (OMS, 2020). Aunque ambos tipos de diabetes poseen una predisposición genética, los genes están más caracterizados en el tipo I (Kharroubi y Darwish, 2015).

La DMT2 se puede presentar con síntomas similares a la diabetes tipo I, no obstante, su aparición es mucho menos drástica y puede ser asintomática. Debido a los síntomas leves en el inicio, el diagnóstico usualmente llega en un periodo avanzado de la enfermedad, especialmente en países donde el chequeo regular no forma parte de la cultura. Este retardo en el diagnóstico puede incrementar las complicaciones a largo plazo, ya que la hiperglucemia no es tratada durante todo el periodo sin diagnóstico (Kharroubi y Darwish, 2015).

De acuerdo con los criterios establecidos por la OMS y la NOM-015-SSA12-2010: Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus, el diagnóstico se establece mediante los signos clásicos de hiperglucemia y una prueba sanguínea anormal: glucemia plasmática casual  $\geq 200$  mg/dL; glucemia plasmática en ayuno  $\geq 126$  mg/dL; o bien glucemia  $\geq 200$  mg/dL a las dos horas de una carga oral de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua. Además, puede realizarse una

prueba de hemoglobina glucosilada (HbA1C) para diagnosticar la DMT2, el valor de la HbA1C no debe ser superior al 6.5% (OMS, 2020; Campuzano y Latorre, 2010).

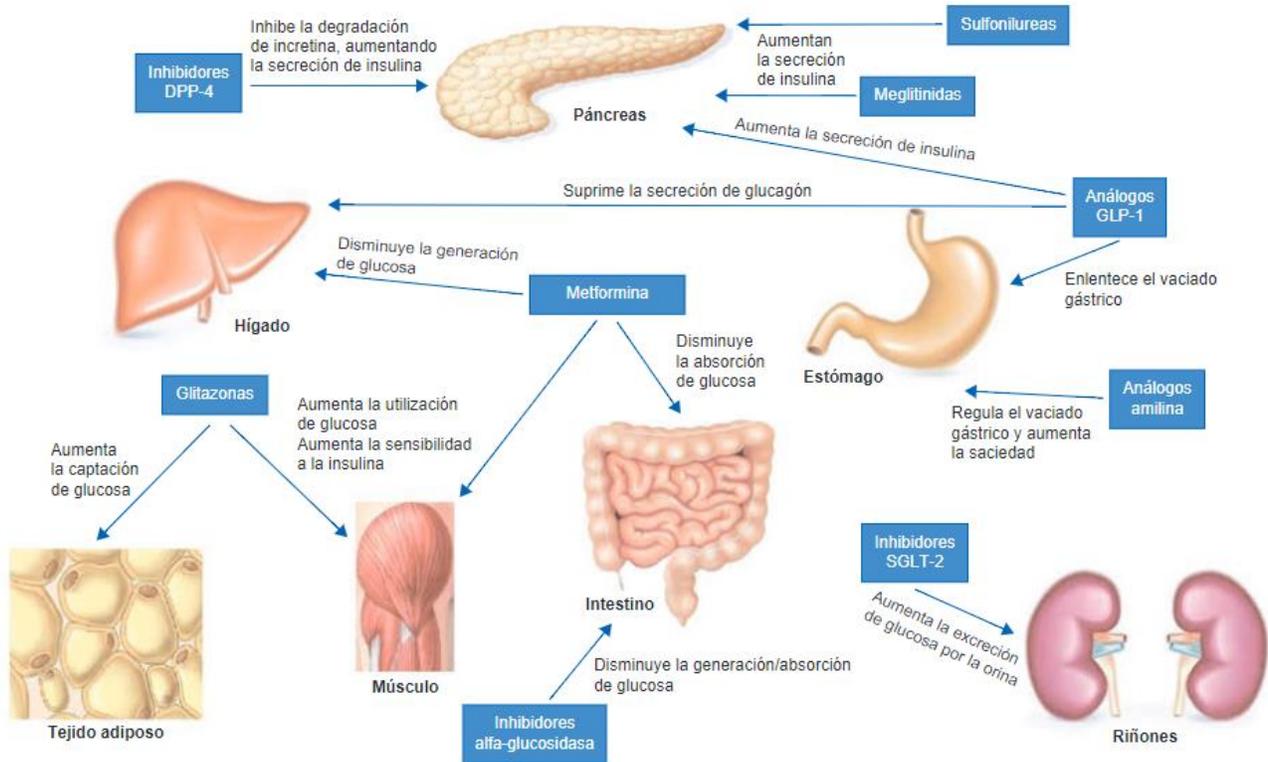
### **1.1.3 Tratamientos para la diabetes mellitus tipo II**

La terapia farmacológica inicial debe basarse en las características clínicas y bioquímicas del paciente, tomando en cuenta los posibles riesgos que podrían presentarse en algunos escenarios clínicos. En el caso de DMT1, al existir una carencia total de insulina, la terapia consiste en aplicación de insulina exógena (Israili, 2011).

El objetivo de los tratamientos para la DMT2 es reducir el riesgo de complicaciones a largo plazo y la mortalidad asociada. La disminución de la hemoglobina glucosilada A1C (HbA1C), el indicador para la regulación de la diabetes y su seguimiento, conducen a la reducción de complicaciones vasculares y mortalidad relacionada a diabetes (37% y 21%, respectivamente). Un control estricto de la glicemia (HbA1c < 6.5%) puede reducir algunas de las complicaciones relacionadas con la diabetes (Upadhyay *et al.*, 2018).

El cuidado y tratamiento de los pacientes con DMT2 consisten en cambios en el estilo de vida, que incluya una dieta sana, actividad física regular, no fumar y el mantenimiento de un peso corporal saludable. Estos cambios, acompañados por fármacos que ayuden a disminuir los niveles de glucosa, pueden ser suficientes para mejorar la calidad de vida y disminuir los riesgos que conlleva esta enfermedad (Ríos *et al.*, 2016).

Dentro de los fármacos hipoglucemiantes empleados, la metformina es el de primera elección, aunque en la actualidad se dispone de una variedad de opciones para el tratamiento farmacológico (**Tabla 2, Figura 2**). Cuando la medicación oral no es suficiente para controlar la hiperglucemia según los niveles recomendados, pueden requerirse inyecciones de insulina (FID, 2019). A continuación, se resumen los principales grupos de fármacos que se emplean para el tratamiento de la DMT2.



**Figura 2.** Mecanismos de acción de los distintos fármacos antidiabéticos (Imagen modificada de Bermejo *et al.*, 2017).

a) Sulfonilureas

Estimulan la liberación de insulina a partir de las células pancreáticas. Estos fármacos se unen al receptor (SUR)-1 de las células  $\beta$  pancreáticas cerrando los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ), lo que genera una despolarización de la membrana celular, entonces los canales de calcio dependientes de voltaje son abiertos, activan a las proteínas que controlan la liberación de insulina. Los efectos de estos fármacos son independientes de los valores de glucosa presentes, por lo que presentan un riesgo de hipoglucemia.

b) Meglitinidas

Este tipo de fármacos estimulan la secreción de insulina del páncreas mediante el cierre de los canales de  $K_{ATP}$  en la membrana de las células pancreáticas. Estos fármacos tienen un mecanismo similar al de las sulfonilureas, ya que también se unen al receptor (SUR)-1 de las células  $\beta$  pancreáticas, pero en un sitio diferente.

### c) Biguanidas

La metformina es la biguanida más usada y se recomienda como tratamiento de primera elección en todas las guías clínicas de DM. Su mecanismo de acción consiste en la activación de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK), que inhibe la producción hepática de glucosa. Además, la metformina promueve la fosforilación de los receptores de insulina, reduce la entrada de sustratos glucogénicos (lactato y alanina) y bloquea la respiración mitocondrial. A nivel muscular, la metformina mejora la captación de insulina y glucosa.

### d) Tiazolidinedionas (glitazonas)

Aumentan la sensibilidad a la insulina en todo el organismo: reducen la resistencia a esta hormona, aumentan la captación de glucosa en los músculos y en el tejido adiposo y disminuyen la secreción de glucosa a nivel hepático. Estos efectos resultan de la estimulación del receptor del proliferador activado de peroxisoma  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), de los cuales las tiazolidinedionas son potentes agonistas sintéticos.

### e) Inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas

Los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa bloquean a un grupo de enzimas del epitelio intestinal encargadas de hidrolizar los carbohidratos complejos en glucosa y otros monosacáridos. Con ello se logra una disminución de la hiperglucemia postprandial.

### f) Inhibidores de la dipeptidil dipeptidasa-4 (DPP-4)

El polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) y el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) son dos péptidos intestinales (incretinas) que se liberan en función de la concentración de glucosa o nutrientes en el intestino. La principal función de estas incretinas es promover la secreción de insulina. Estos péptidos se inhiben gracias a la enzima DPP-4, con lo cual se reduce su vida media de forma importante. Los inhibidores de la DPP-4 limitan la degradación de GLP-1 y GIP, produciendo un aumento en la liberación de insulina y una disminución de la concentración de glucagón.

g) Agonistas del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1)

Los agonistas de GLP-1 tienen un efecto incretina directo de tal forma que promueven la secreción de insulina dependiente de glucosa por las células beta-pancreáticas, suprimen la secreción de glucagón y enlentecen el vaciado gástrico.

h) Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa subtipo 2 (SGLT-2)

Estos fármacos actúan bloqueando la activación del transportador sodio-glucosa subtipo 2 a nivel del túbulo proximal, donde se reabsorbe un 90% de la glucosa filtrada en el glomérulo. Al inhibir estos transportadores se evita la reabsorción de la glucosa. Entonces la excreción por vía urinaria se ve aumentada, lo que genera una disminución de los niveles de glucosa en sangre.

**Tabla 2.** Agentes antidiabéticos y su mecanismo de acción (modificada de Kerru *et al.*, 2018)

Clase	Fármacos	Mecanismo de acción
<b>Diabetes tipo I</b>		
Terapia con insulina	Insulina	Estimula la fosforilación de los receptores de insulina
Análogos de amilina	Pramlintida	Mejora el control glucémico mediante la modulación de la tasa de vaciamiento gástrico, previniendo un incremento en los niveles de glucagón postprandiales, e incrementando los niveles de saciedad.
<b>Diabetes tipo II</b>		
Sulfonilureas	Gliclazida	Estimulan al páncreas para producir más insulina.
	Glimepirida	
	Glibenclamida	
Meglitinidas	Nateglinida	Estimulan al páncreas para producir más insulina.
	Repaglinida	
Biguanidas	Metformina	Reducen la producción de glucosa en el hígado.
	Tiazolidinedionas (TZD)	Pioglitazona
Rosiglitazona		
Inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas	Acarbosa	Retardan la absorción de carbohidratos (azúcares) ingeridos.
	Miglitol	
Inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4)	Linagliptina	Intensifican el efecto de las incretinas involucradas en el control de los niveles de glucosa en sangre.
	Saxagliptina	
	Sitagliptina	
	Alogliptina	
Agonista del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1)	Exenatida	Simulan el efecto de las incretinas involucradas en el control de los niveles de glucosa en sangre.
	Liraglutida	
	Dulaglutida	
Inhibidores del cotransportador-2 sodio-glucosa (SGLT2)	Canaglifozina	Ayuda a eliminar la glucosa en la orina.
	Dapaglifozina	
	Empaglifozina	

### 1.1.3.1 El papel de las plantas medicinales para el tratamiento para la DMT2

Históricamente todos los pueblos del mundo han usado las plantas medicinales para atender sus problemas de salud y hasta el día de hoy, la gran mayoría de países, desarrollados y en desarrollo, siguen utilizándolas. Se estima que entre el 80% y 85% de la población mundial, emplea medicina tradicional para la atención primaria de su salud, y los principales recursos de esta terapia alternativa son las plantas. Actualmente, la medicina tradicional y las plantas medicinales están ganando una mayor aceptación para el tratamiento de padecimientos crónicos; las tendencias indican que la importancia de las terapias vegetales será mayor en los próximos años y que habrá grandes esfuerzos para incorporarlas a los sistemas oficiales de salud (APTMT, 2015; Osadebe *et al.*, 2014).

México es considerado uno de los países más biodiversos del mundo, existe un estimado de 23,400 plantas vasculares, de las cuales más de cuatro mil tienen usos medicinales. El uso de plantas medicinales en el país ha sido registrado desde tiempos prehispánicos y sobrevive hasta nuestros días, transmitiéndose de generación en generación (Alonso-Castro *et al.*, 2017). Las plantas medicinales, sin duda, son el recurso material más amplio y valioso de la medicina tradicional mexicana, y el mejor testimonio de su eficacia y valor cultural es su persistencia en los mercados del país hoy en día, donde se vende el mayor porcentaje de plantas aromáticas y medicinales (APTMT, 2015; Mata *et al.*, 2019).

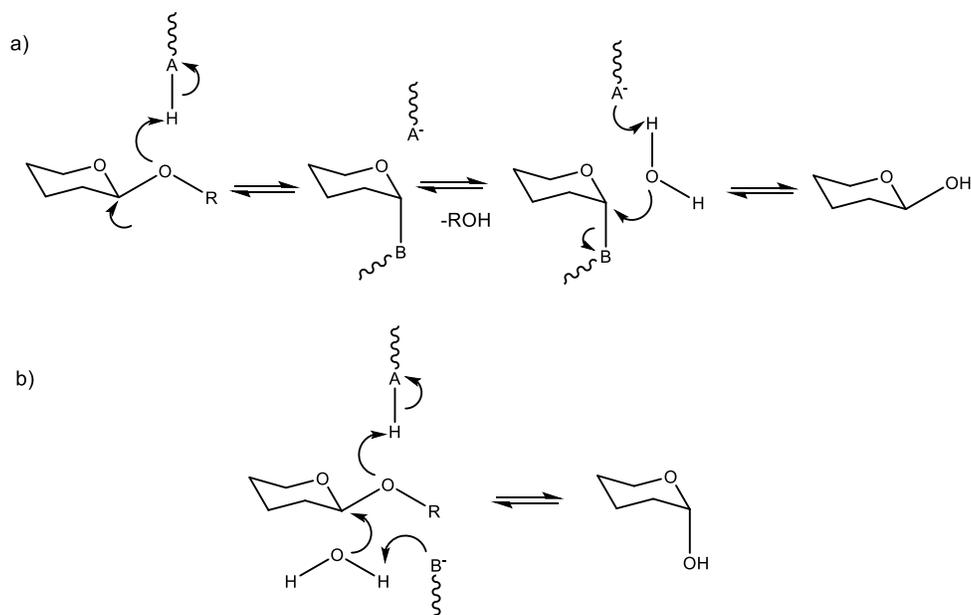
Debido a la alta incidencia de la diabetes en México, además de la falta de recursos económicos y acceso a servicios de salud, es común el uso de plantas para tratar los síntomas de esta enfermedad (Alonso-Castro *et al.*, 2017). De acuerdo con algunos expertos, existen más de 300 especies, principalmente de las familias Asteraceae, Fabaceae, Cactaceae, Solanaceae, Euphorbiaceae y Laminaceae, supuestamente benéficas para el paciente diabético; sin embargo, pocas han recibido evaluación científica adecuada (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Mata *et al.*, 2019; Escandón-Rivera *et al.*, 2020).

## 1.2 Enzimas $\alpha$ -glucosidasas

Las  $\alpha$ -glucosidasas son exoenzimas que hidrolizan enlaces glucosídicos, incluyendo oligosacáridos, glucoconjugados y  $\alpha$ -glucanos como almidón soluble en agua y glucógeno. Liberan

$\alpha$ -glucosa a partir del extremo no reductor de la cadena del sustrato. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas y tejidos animales (Krasikov *et al.*, 2001). Este grupo de enzimas cataliza dos tipos de reacciones: la sustitución de un residuo de glucósido desde el extremo no reductor de un oligosacárido por agua (hidrólisis) o la transferencia de este residuo a una molécula aceptora (transglucosilación). Estas reacciones pueden ser consideradas formalmente como una sustitución nucleofílica catalizada por ácido en el átomo de carbono C<sub>1</sub> (el carbono anomérico). La hidrólisis ocurre por medio de dos mecanismos principalmente, dando como resultado una retención o una inversión de la configuración del anomérico (**Figura 3**). De este modo, se reconocen dos tipos de enzimas: de retención y de inversión. Las  $\alpha$ -glucosidasas y glucoamilasas pertenecen al primer y segundo tipo respectivamente (Davies y Henrissat, 1995; Krasikov *et al.*, 2001).

En ambos mecanismos la posición del donador de protón es idéntica. En las enzimas de retención, el nucleófilo se encuentra cerca del carbón anomérico del azúcar. Sin embargo, esta base está más distante en las enzimas de retención, lo que permite el acomodo de una molécula de agua y el azúcar, invirtiendo así la configuración (Davies y Henrissat, 1995).



**Figura 3.** Mecanismos de hidrólisis enzimática de enlaces glucosídicos. a) Retención de la configuración. b) Inversión de la configuración (Imagen modificada de Davies y Henrissat, 1995).

Chiba y Shimomura (1978) propusieron una clasificación de las  $\alpha$ -glucosidasas con base en la especificidad de su sustrato. El primer grupo (Tipo I) son las típicas  $\alpha$ -glucosidasas que hidrolizan

sustratos heterogéneos, y son más activas con fenil- $\alpha$ -glucósido y sacarosa que con maltosa. El segundo grupo (Tipo II) es el de las llamadas maltasas, mostrando una fuerte actividad con sustratos homogéneos, como los malto-oligosacáridos (pero no con  $\alpha$ -glucósidos y sacarosa). El tercer grupo (Tipo III) se caracteriza por mostrar actividad similar a las maltasas del Tipo II, excepto que este tipo también pueden hidrolizar  $\alpha$ -glucanos.

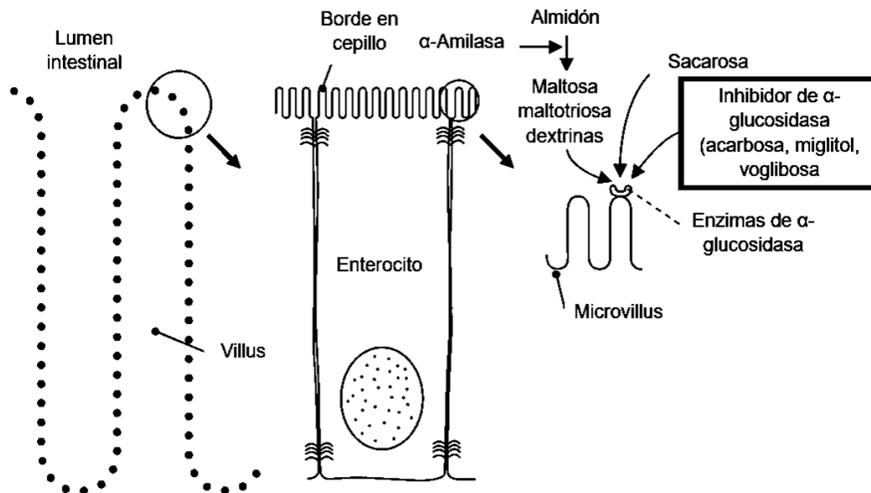
La clasificación moderna de las glucosidasas las agrupa en familias, con base en las similitudes de las secuencias de aminoácidos. Esta clasificación brinda un mayor énfasis en las características estructurales en común que en la especificidad del sustrato (Davies y Henrissat, 1995; Krasikov *et al.*, 2001).

La actividad de estas enzimas  $\alpha$ -glucosidasas es fundamental para muchos procesos bioquímicos, como la degradación de los polisacáridos de la dieta en unidades de monosacáridos, fáciles de absorber para su posterior utilización en el organismo. También están involucradas en el catabolismo de glucoconjugados lisosomales, el procesamiento de las glucoproteínas y la biosíntesis de las unidades de oligosacáridos en glucoproteínas y glucolípidos (Borges de Melo *et al.*, 2006).

En el cuerpo humano, la mayoría de estas enzimas se encuentran en el borde en cepillo en los enterocitos del intestino delgado (**Figura 4**), donde catalizan los últimos pasos en la digestión de los carbohidratos (Mata *et al.*, 2013). Existen dos tipos de  $\alpha$ -glucosidasa en el intestino: la maltasa-glucoamilasa con dominios terminales amino y carboxilo (MGAM), y la sacarasa-isomaltasa (SI) (Lin *et al.*, 2016).

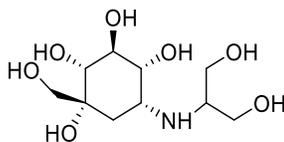
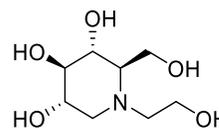
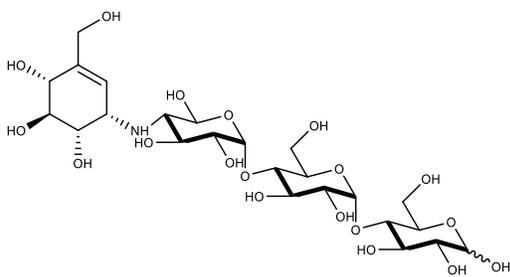
### **1.2.1 Inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas**

Los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasas actúan bloqueando competitivamente a esta enzima, retardando la tasa de digestión de carbohidratos complejos en glucosa y otros monosacáridos, de tal forma que disminuyen la hiperglucemia postprandial (Israili, 2011; Krentz y Bailey, 2005). El uso a largo plazo de estos fármacos causa una reducción de HbA1c del 0.7%-0.8% (Israili, 2011).



**Figura 4.** Mecanismo de acción de los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas en el borde en cepillo de los enterocitos intestinales (Imagen modificada de Krentz y Bailey, 2005)

En el mercado farmacéutico existen tres fármacos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas: la acarbose (1) (aprobada en 1995), obtenida a partir de varias especies del género *Actinoplanes*, el miglitol (2) (aprobado en 1996) obtenido a partir de especies de *Bacillus* y *Streptomyces*, y la voglibosa (3) (aprobada en 1997), que se obtiene por semisíntesis a partir de la valiolamina, aislado de *Streptomyces hidroscopticus* subespecie *limoneus* (Israili, 2011; Ríos *et al.*, 2016).



Estos productos ocasionan efectos secundarios gastrointestinales, incluyendo diarrea, flatulencias y sensación de saciedad al comer, además su costo es mediano y el miglitol se absorbe (Israili, 2011; Yin, 2014). Por estos motivos es necesario buscar alternativas terapéuticas. Así en los últimos años, los proyectos dirigidos a descubrir inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas a partir de fuentes naturales han recibido mucha atención, en particular por la diversidad estructural de los productos naturales y sus prometedoras actividades biológicas (Yin, 2014). Como resultado de esta búsqueda, se han aislado algunos productos naturales con propiedades inhibitorias para las  $\alpha$ -glucosidasas a partir de plantas, en su mayoría flavonoides y alcaloides, pero también se incluyen algunos terpenoides y glucósidos de antocianinas (Mata *et al.*, 2013).

### 1.3 Generalidades sobre el género *Ageratina*

#### 1.3.1 Aspectos taxonómicos y distribución geográfica

El género *Ageratina* pertenece a la familia Asteraceae, tribu Eupatorieae; está compuesto por aproximadamente 290 especies distribuidas a lo largo de Norte y Sudamérica, con la mayoría de las especies concentradas en Centroamérica (Ramawat, 2019).



**Figura 5.** Distribución del género *Ageratina*. Imagen modificada de Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2020).

El género fue descrito por primera vez por Edouard Spach (1841) en *Histoire Naturelle des Végétaux*, con la especie tipo *Eupatorium aromaticum*. En 1970 King y Robinson reclasificaron

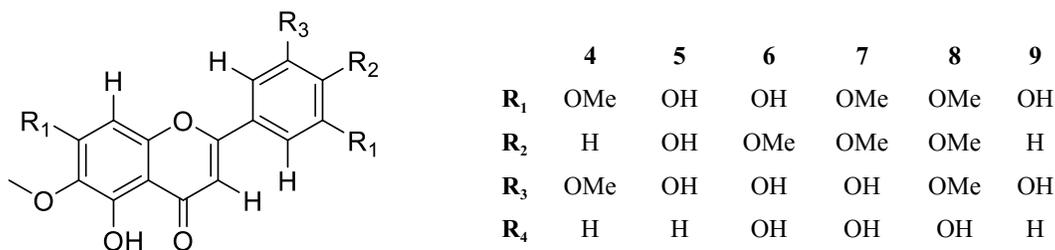
especies de *Ageratina* a partir de la sinonimia del amplio género *Eupatorium*. El nombre *Ageratina* deriva del latín “parecido a *Ageratum*”, otra especie de la tribu Eupatorieae.

El género *Ageratina* es el más grande de la familia Asteraceae en México y es el sexto género más grande de las plantas vasculares mexicanas (Villaseñor, 2018). Comprende 167 especies en el país, de las cuales 135 son endémicas y 41 microendémicas, es decir, restringidas a un estado. Este género es común en la montaña húmeda y en bosques de coníferas, así como en bosques secos tropicales y matorrales xerófilos (Hinojosa *et al.*, 2019).

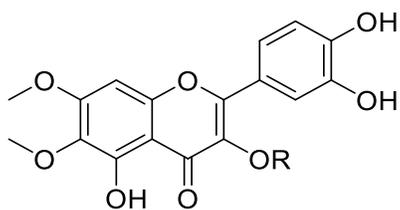
### 1.3.2 Química del género

Los estudios químicos de algunas especies de *Ageratina* han mostrado que el género está caracterizado, principalmente por la presencia de flavonoides, terpenoides, *p*-hidroxiacetofenonas, cromenos, benzofuranos y derivados de timol (Arciniegas *et al.*, 2018; Aguilar *et al.*, 2009; Bohlman *et al.*, 1985).

Dentro de los flavonoides aislados, destacan los del tipo flavona y flavonol. En el grupo de las flavonas, Herz y colaboradores (1972) aislaron salvigenina (**4**) a partir de *A. gilbertii*; de *A. tomentella* (Fang *et al.*, 1986) se aislaron 6-metoxiluteolina (**5**), sus derivados 3'-metil éter (**6**), 7,3'-dimetil éter (**7**), 7,3',4'-trimetil éter (**8**), y 6-metoxiapigenina (**9**).

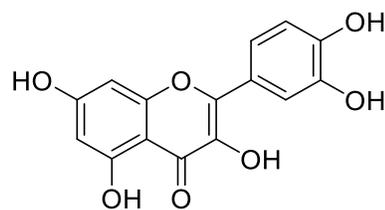


Entre los flavonoles se ha descrito la presencia de 6,7-dimetoxi-3,5,3',4'-tetrahidroxiflavona-3-*O*-apiósido (**10**), 6,7-dimetoxi-3,5,3',4'-tetrahidroxiflavona-3-*O*-ramnósido (**11**) y 6,7-dimetoxi,3,5,3',4'-tetrahidroxiflavona-3-*O*-galactósido (**12**) y quercetina (**13**) en *A. calophylla* (Fang *et al.*, 1986). Yu *et al.* (1986) aislaron a partir de *A. saltillensis* 6-metoxikaempferol (**14**) y su 3-*O*-glucósido (**15**) y 3-*O*-ramnósido (**16**), patuletina (**17**) y sus 3-metil éter (**18**), 3',4'-dimetil éter, 3-*O*-glucósido (**19**) y 7-metil-éter-3-*O*-ramnósido (**20**). Por otra parte, en *A. adenophora* se encontraron 4'-metilquercetagina-7-*O*-(β-D-cafeoilglucopiranosido) (**21**) y quercetagina-7-*O*-(β-D-acetilglucopiranosido) (**22**) (Wei *et al.*, 2011).

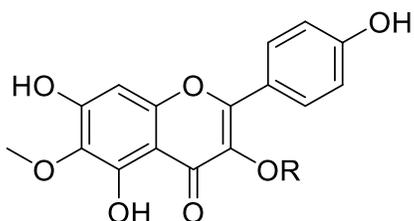


**R**

- 10** Apiosa  
**11** Ramnosa  
**12** Galactosa

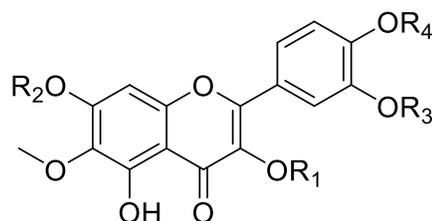


**13**



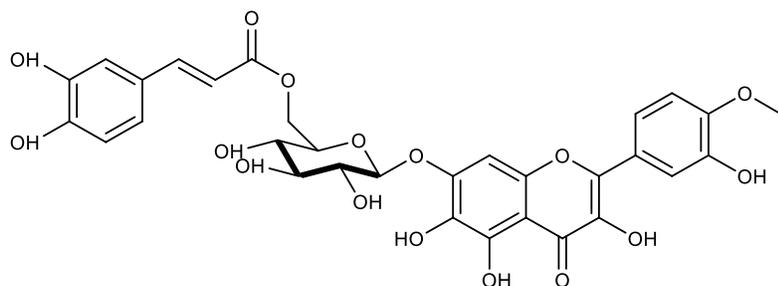
**R**

- 14** H  
**15** Glucosa  
**16** Ramnosa

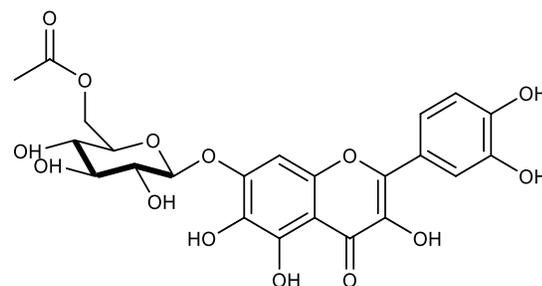


**R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> R<sub>4</sub>**

- 17** H H H H  
**18** Me H H H  
**19** Glucosa H Me Me  
**20** Ramnosa Me H H

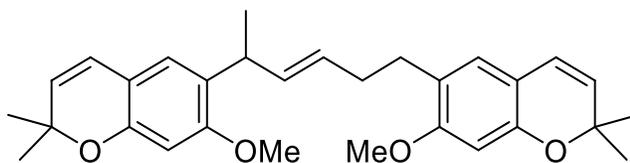
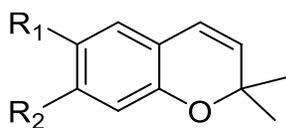


**21**



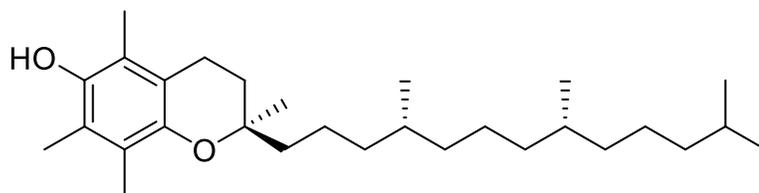
**22**

La separación del extracto de cloruro de metileno de *A. arsenei* (Fang *et al.*, 1988) permitió el aislamiento de los cromenos desmetoxiencalina (**23**), encocalinol (**24**), *O*-metilencalinalol (**25**), androencalinalol (**26**), agerasanina (**27**), vitamina E (**28**) y 6-[2-(2-hidroxi-4-metil-isopropilfenil)-etil]-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (**29**), además de 3,5-bis[isopenten-2-il]-4-hidroxiacetofenona (**30**).

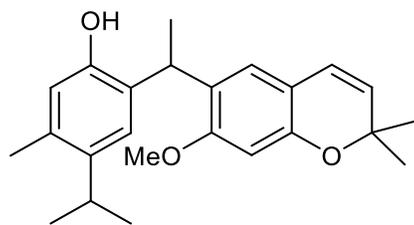


27

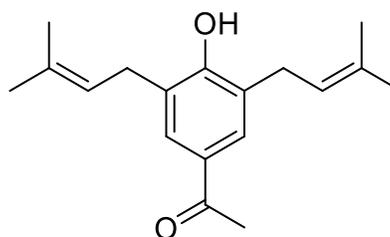
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
23	COCH <sub>3</sub>	H
24	CH(OH)CH <sub>3</sub>	OMe
25	CH(OCH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub>	OMe
26	CH=CH <sub>2</sub>	OMe



28

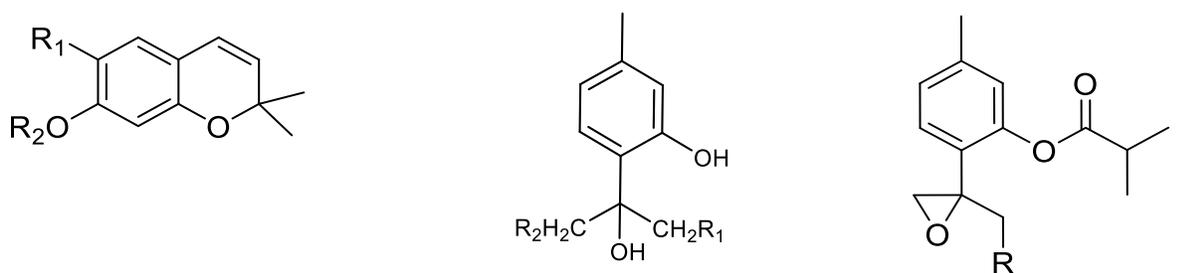


29



30

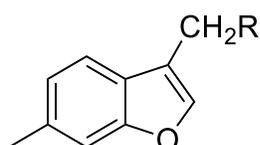
El estudio de las partes aéreas de *A. glechonopylla* (González *et al.*, 1989) dio como resultado el aislamiento de los cromenos **24**, **25**, *O*-etilencecalinol (**31**), encecalina (**32**), desmetilencecalina (**33**), los timoles 8-hidroxi-9,10-diisobutiriloxitimol (**34**), 8,9-dihidroxi-10-acetiloxitimol (**35**), isobutirato de 10-acetoxi-8,9-epoxitimol (**36**), isobutirato de 10-isobutiriloxi-8,9-epoxitimol (**37**), y los benzofuranos 3-hidroximetil-6-metilbenzofurano (**38**), 3-acetoximetil-6-metilbenzofurano (**39**) y 3-isobutiriloximetil-6-metilbenzofurano (**40**).



	$R_1$	$R_2$
31	CH(OEt)CH <sub>3</sub>	Me
32	COCH <sub>3</sub>	Me
33	COCH <sub>3</sub>	H

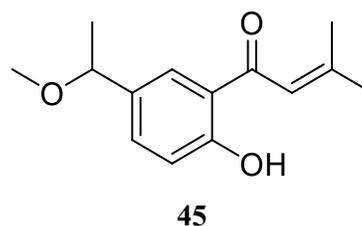
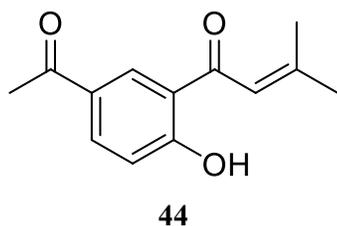
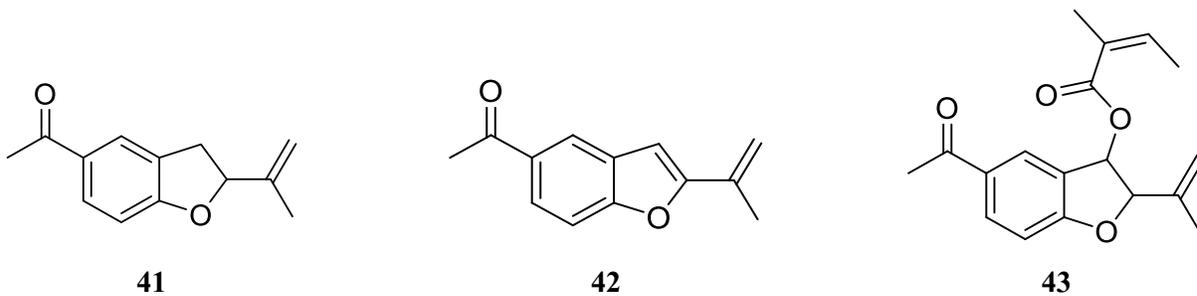
	$R_1$	$R_2$
34	OCOCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OCOCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
35	OH	OCOCH <sub>3</sub>

	$R$
36	OCOCH <sub>3</sub>
37	OCOCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

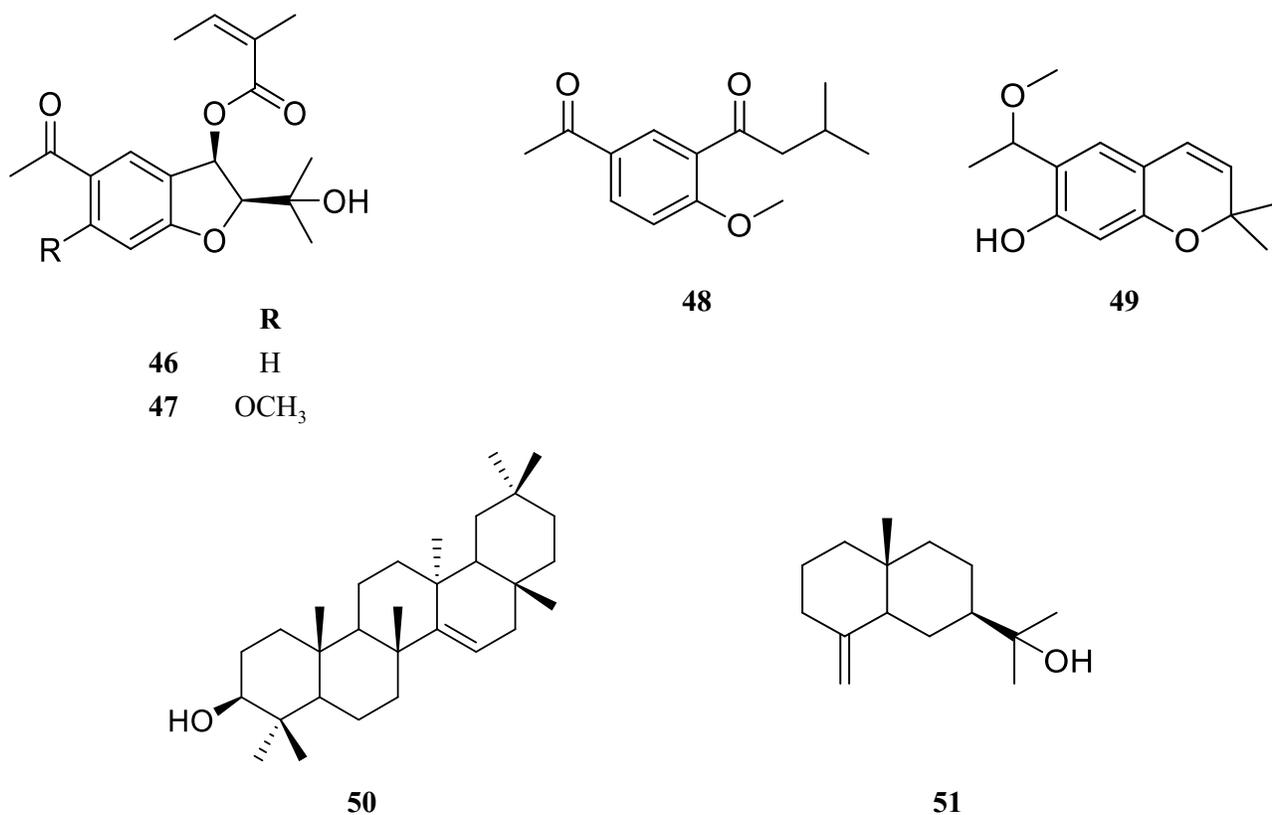


	$R$
38	OH
39	OCOCH <sub>3</sub>
40	OCOCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

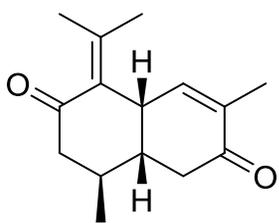
Un estudio realizado a *A. altissima* (Lee *et al.*, 2009) permitió el aislamiento de tremetona (**41**), dehidrotremetona (**42**) y 3-oxiangeloil-tremetona (**43**) mientras que una investigación posterior (Lee *et al.*, 2010) evidenció la presencia de las *p*-hidroxiacetofenonas 4-acetilfenol de 2-senecioilo (**44**) y 4-(1-metoxietil)fenol de 2-senecioilo (**45**).



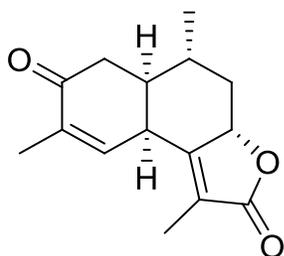
A partir de *A. pichichensis* (Aguilar Guadarrama *et al.*, 2009) se ha reportado el aislamiento de 5-acetil-3- $\beta$ -angeloiloxi-2- $\beta$ -(1-hidroxiopropil)-2,3-dihidrobenzofurano (**46**), 5-acetil-3- $\beta$ -angeloiloxi-2- $\beta$ -(1-hidroxiopropil)-6-metoxi-2,3-dihidrobenzofurano (**47**), espeletona (**48**), **24**, **25**, **26**, sonorol (**49**), taraxerol (**50**) y  $\beta$ -eudesmol (**51**).



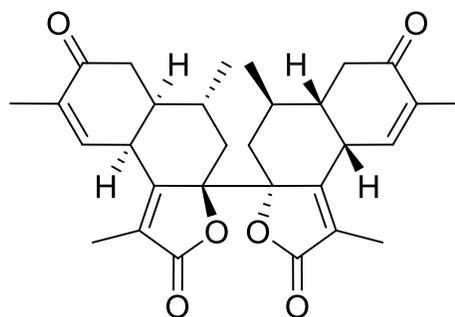
El estudio de *A. adenophora* condujo al aislamiento del sesquiterpenoide 9-oxo-dehidroageroforona (**52**) (Oelrichs *et al.*, 1995). El extracto elaborado con metanol de esta misma especie (He *et al.*, 2008) contiene sesquiterpenos de cadinano: (+)-(5*R*,7*S*,9*R*,10*S*)-2-oxocadinan-3,6(11)-dien-7,12-ólido (**53**), (+)-7,7'-bis[(5*R*,7*R*,9*R*,10*S*)-2-oxocadinan-3,6(11)-dien-7,12-ólido (**54**), (5*R*,7*S*,9*R*,10*S*)-7-hidroxi-7,12-epidioxicadinan-3,6(11)-dien-2-ona (**55**) y (5*R*,6*R*,7*S*,9*R*,10*S*)- amorf-4-en-7-ol (**56**). Finalmente, el análisis del extracto de etanol (Zhou *et al.*, 2013) dio como resultado el aislamiento de 9-*O*-*trans*-ferulato de 7-hidroxi-8,9-dehidrotimol (**57**), 3-(2-hidroxifenil)propil metil malonato (**58**) 9-*O*-*trans*-ferulato de 7-hidroxitimol (**59**), 9-*O*-*trans*-ferulato de 7,8-dihidroxitimol (**60**).



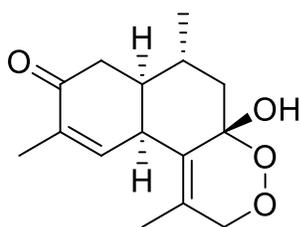
52



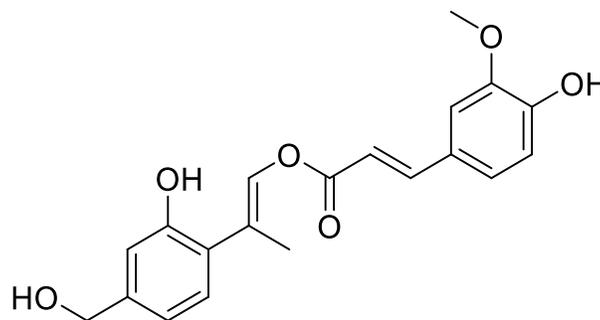
53



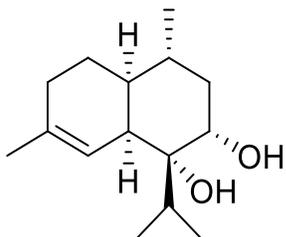
54



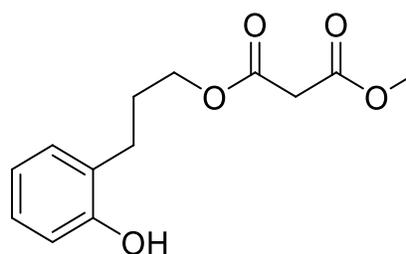
55



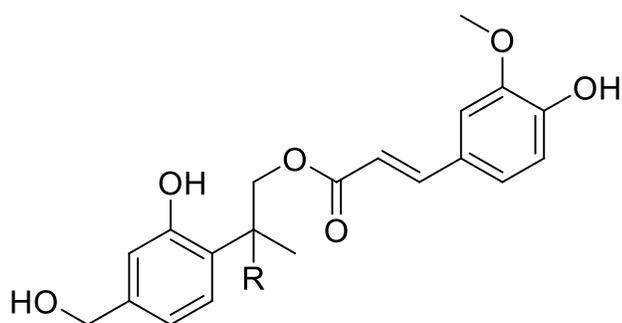
57



56



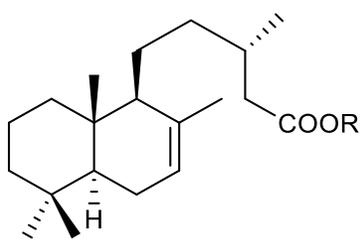
58



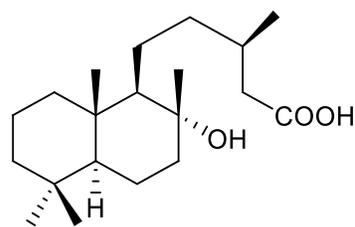
	<b>R</b>
<b>59</b>	H
<b>60</b>	OH

La investigación química del extracto hexánico de *A. jocotepecana* (García *et al.*, 2014) llevó al aislamiento de los siguientes diterpenoides: ácido (-)-(5*S*, 9*S*, 10*S*, 13*S*)-labd-7-en-15-oico (**61**), (-)-(5*S*, 9*S*, 10*S*, 13*S*)-labd-7-en-15-oato de metilo (**62**), ácido (+)-(5*S*, 8*R*, 9*R*, 10*S*, 13*R*)-8-hidroxilabdan-15-oico (**63**) y ácido (-)-(5*S*, 9*S*, 10*S*, 13*R*)-labda-7,13-dien-15-oico (**64**). En 2014,

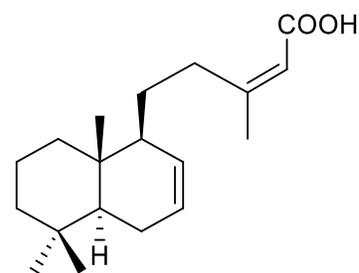
Bustos Brito *et al.* reportaron la presencia de un derivado de timol de las hojas de *A. cylindrica*: isobutirato de (+)-(8*S*)-8,9-epoxi-6-hidroxi-10-benzoiloxi-7-oxotimol (**65**). Más adelante se encontraron glucósidos de ácidos *ent*-kaurenóicos en el extracto acuoso de la misma especie (Bustos-Brito *et al.*, 2015): ácido *ent*-15 $\beta$ -( $\beta$ -L-fucosiloxi)kaur-16-en-19-óico  $\beta$ -D-glucopiranosil éster (**66**), ácido *ent*-15 $\beta$ -(4-acetoxi- $\beta$ -L-fucosiloxi)kaur-16-en-19-óico  $\beta$ -D-glucopiranosil éster (**67**), ácido *ent*-15 $\beta$ -(3-acetoxi- $\beta$ -L-fucosiloxi)kaur-16-en-19-óico  $\beta$ -D-glucopiranosil éster (**68**), ácido *ent*-15 $\beta$ -( $\beta$ -L-fucosiloxi)kaur-16-en-19-óico (**69**), ácido *ent*-15 $\beta$ -(4-acetoxi- $\beta$ -L-fucosiloxi)kaur-16-en-19-óico (**70**), ácido *ent*-15 $\beta$ -(3-acetoxi- $\beta$ -L-fucosiloxi)kaur-16-en-19-óico (**71**).



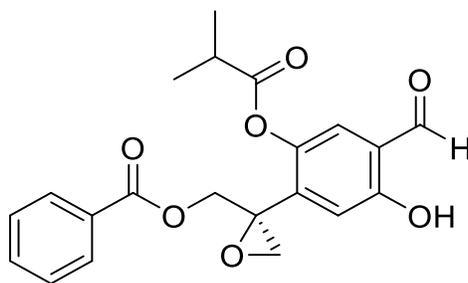
**R**  
**61** Me  
**62** H



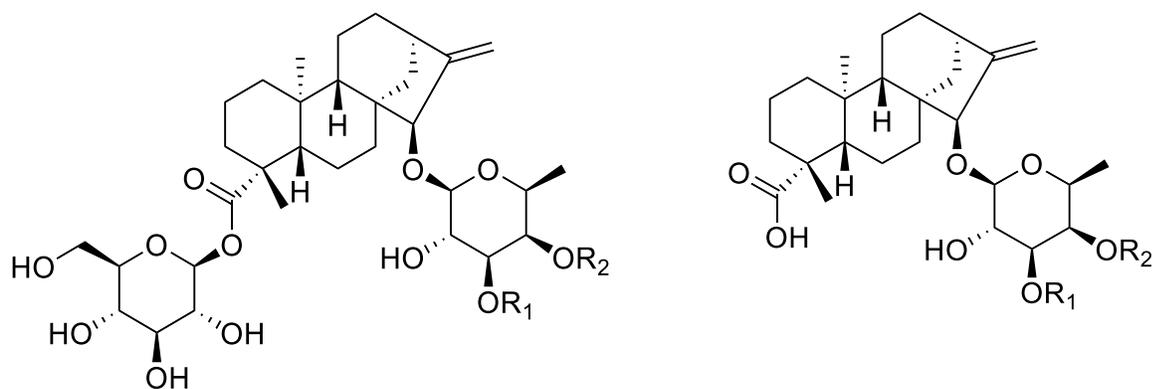
**63**



**64**



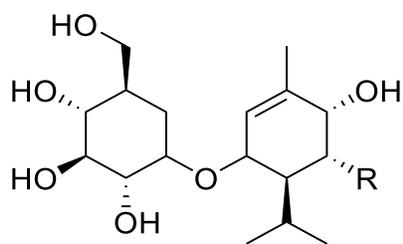
**65**



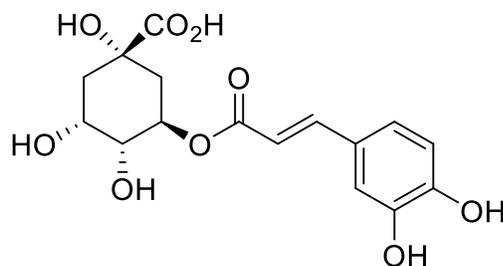
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>66</b>	H	H
<b>67</b>	H	Ac
<b>68</b>	Ac	H

	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>69</b>	H	H
<b>70</b>	H	Ac
<b>71</b>	Ac	H

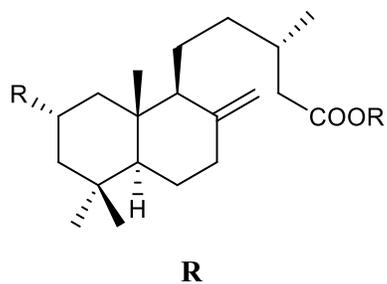
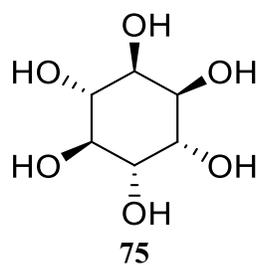
Dentro de los reportes más recientes del género se encuentran el de Pardo-Novoa *et al.* (2016), quienes analizaron las partes aéreas de *A. glabrata* encontrando la presencia de los monoterpenoides (-)-(3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,5,6-trihidroxi-1-menteno 3-*O*-β-D-glucopiranosido (**72**), (-)-(3*S*,4*S*,6*R*)-3,6-dihidroxi-1-menteno-3-*O*-β-D-glucopiranosido (**73**). Por otro lado, en *A. petiolaris* (Bustos Brito *et al.*, 2016) se identificaron ácido clorogénico (**74**), L-*qui*ro-inositol (**75**), ácido 2α-*iso*-valeroiloxiperuico (**76**), ácido 2α-tigloxiperuico (**77**), 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de bencilo (**78**), 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**79**), 2,6-dimetoxibenzoato de 3-metoxibencilo (**80**) y 2-hidroxi-3,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**81**).



	<b>R</b>
<b>72</b>	OH
<b>73</b>	H

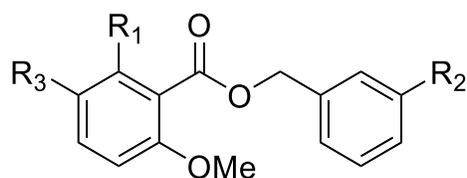


**74**



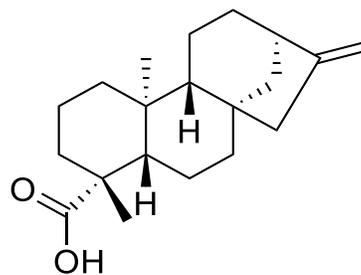
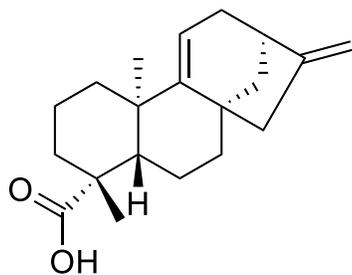
76 *O*-isovaleroil

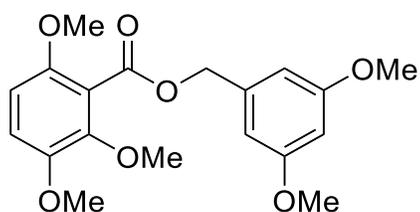
77 *O*-tigloil



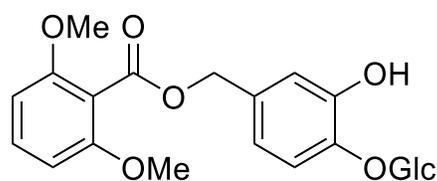
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
<b>78</b>	OH	H	H
<b>79</b>	OMe	H	H
<b>80</b>	OMe	OMe	H
<b>81</b>	OH	H	OMe

Por último, Arciniegas *et al.* (2018), realizaron el estudio de *A. deltoidea*, que condujo al aislamiento de ácido grandiflorénico (**82**), ácido *ent*-kaurenóico (**83**), y dos benzoatos de bencilo novedosos: 2,3,6-trimetoxibenzoato de 3,5-dimetoxibencilo (**84**), -2,6-dimetoxibenzoato de 4-(β-D-glucopiranosiloxi)-3-hidroxi-bencilo (**85**).





84

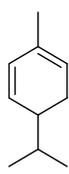


85

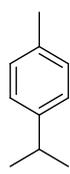
Los aceites esenciales del género *Ageratina* se caracterizan por la presencia de monoterpenoides y sesquiterpenoides. Gran parte de estas investigaciones se han centrado en la especie *A. adenophora*, a partir de la cual se han identificado como compuestos mayoritarios al canfeno (**86**),  $\alpha$ -felandreno (**87**), *p*-cimeno (**88**), acetato de bornilo (**89**),  $\beta$ -cariofileno (**90**),  $\gamma$ -curcumeno (**91**), amorfa-4,7(11)-dien-8-ona (**92**), 3-acetoxiamorfa-4,7(11)-dien-8-ona (**93**) y **56** (Weyerstahl *et al.*, 1997; Pala *et al.*, 2002; Pandalia *et al.*, 2009). En 2013, Torres y colaboradores investigaron la composición del aceite esencial de *A. jahnii* y *A. pichichensis*, los metabolitos más relevantes se caracterizaron como  $\beta$ -mirceno (**94**),  $\alpha$ -pineno (**95**) y limoneno (**96**) en el caso de *A. jahnii*, mientras que para *A. pichichensis*, fueron isobutirato de 8,9-epoxitimol (**97**), isobutirato de timol (**98**), germacreno D (**99**), **24** y **33**. Carrillo *et al.* (2015) encontraron en *A. tinifolia*  $\gamma$ -cadineno (**100**),  $\beta$ -sesquifelandreno (**101**), **82**, y **86**. Por último, el estudio de *A. jocotepecana* (Ramírez *et al.*, 2016), evidenció al carvacrol (**102**), espatulenol (**103**), terpinen-4-ol (**104**) y **90** como los productos más importantes de la esencia.



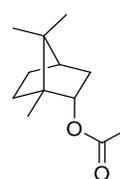
86



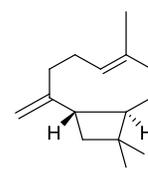
87



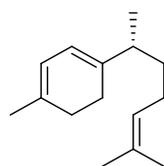
88



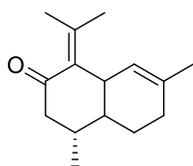
89



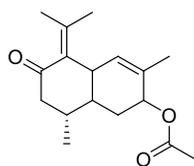
90



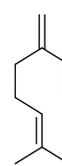
91



92



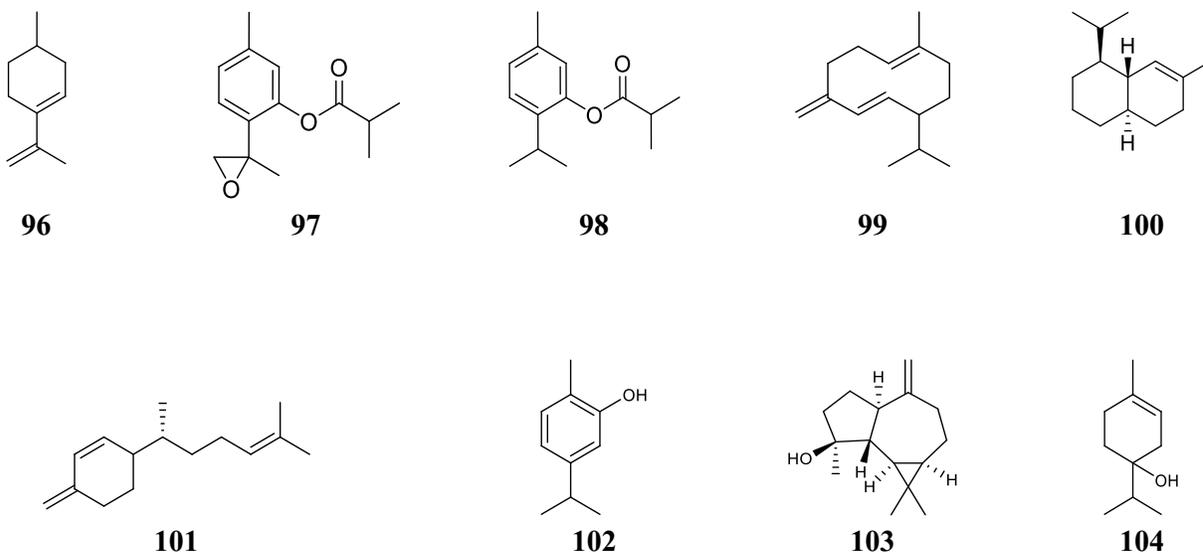
93



94



95



### 1.3.3 Usos tradicionales y actividad farmacológica

Los primeros reportes del uso de *Ageratina* en México parecen remontarse al siglo XVI. Francisco Hernández en su obra “Historia de las Plantas de la Nueva España”, tomo I, libro primero, capítulo LXXXVI, menciona un ‘segundo Axihuitl’ o hierba del agua, que por sus características bien podría tratarse de *A. pichinchensis*. El autor reporta que esta planta “tomada quita la flatulencia, calienta el estómago, disuelve o madura los tumores, cura las llagas inveteradas, combate el frío, mitiga el dolor que proviene de él y aprovecha a los que están resfriados.”

Más adelante, en 1883, Agustín Payro publicó “Estudio sobre la yerba del ángel”, también conocida por su nombre en náhuatl ‘Yolochichitl’ (*A. petiolaris*), empleada desde tiempos de los aztecas para tratar afecciones gastrointestinales. Además, menciona que se emplea como febrífuga y para la fabricación de cerveza. En 1887, en la Gaceta Médica de México se reporta el empleo de *A. glabrata* o hierba del aire como un remedio para padecimientos nerviosos y reumáticos.

Actualmente *A. petiolaris* se emplea como tratamiento para la DMT2 (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005); por otro lado, de acuerdo al INAH, *A. pichinchensis* (Axihuitl) se utiliza para problemas digestivos, de la piel, de circulación y regulación de los niveles de glucosa; en la región del sur, en Chiapas, *A. ligustrini* es empleada para tratar afecciones gastrointestinales (Meckes *et al.*, 1995), mientras que en Oaxaca, *A. rhomboidea* y *A. espinosarum* se usan para tratar el “frío y calor en el estómago” (García Hernández *et al.*, 2015).

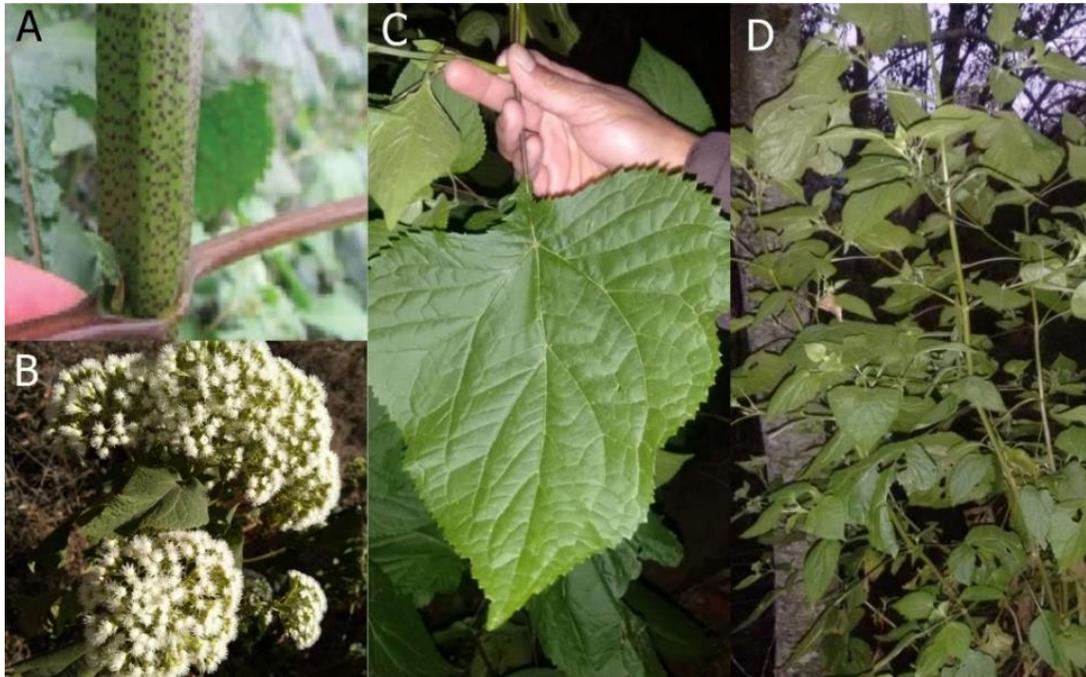
Algunas especies del género han sido sujeto de evaluaciones biológicas varias. Así, Meckes *et al.* (1995) reportaron la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *A. ligustrina* contra *Staphylococcus aureus*. Posteriormente Kurade *et al.*, (2010) documentaron la composición del aceite esencial de *A. adenophora* y su eficacia contra *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* y *S. aureus*.

La especie *A. pichinchensis* presenta propiedades antimicóticas de utilidad para el tratamiento de *tinea pedis* con un extracto estandarizado de la planta bajo la forma de crema (10 %), mientras que un supositorio al 7 % es eficaz para el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal (Romero Cerecero *et al.*, 2006; Romero Cerecero *et al.*, 2017); esta misma planta se emplea también como un cicatrizante en pacientes con úlceras venosas en los miembros inferiores (Romero Cerecero *et al.*, 2012). En 2011, Barrio *et al.*, informaron sobre los resultados positivos del empleo de *A. havanensis* contra los virus vesivirus de conejo (RaV) y de herpes humano simple tipo 1 y 2 (HSV-1, HSV-2). Posteriormente Rojas *et al.* (2015) evaluaron un extracto hexánico de las flores de *A. arsenei* para probar su actividad antinociceptiva.

Bustos Brito *et al.* (2016) evaluaron el potencial hipoglucemiante de *A. petiolaris*; para ello ensayaron los extractos acuoso y elaborado con metanol, obtenidos ambos de las partes aéreas de la planta, en ratas con hiperglucemia inducida por nicotinamida-estreptozotocina; los resultados indicaron que la administración oral de los extractos, en dosis de 40 y 160 mg/kg para el acuoso y 67 y 268 mg/kg para el metanólico provocaban una disminución de los niveles de glucosa en sangre, tres horas después de la administración. Cabe mencionar que esta planta se emplea tradicionalmente en México para tratar la DMT2.

#### **1.3.4 Generalidades sobre la especie *Ageratina grandifolia***

*Ageratina grandifolia* (Regel) R.M. King & H. Rob es una planta endémica de México, perenne, leñosa en la base; algunas veces se presenta como subarbusto; generalmente en matas, hasta de 4 m de altura; sus ramas son subhexagonales, verdes, a menudo con manchas oscuras, con huecos en los internodos; las hojas son predominantemente ovada-deltoides, de hasta casi 30 cm de largo y ancho, con bases decurrentes-aserradas (Hinojosa *et al.*, 2019).



**Figura 6.** *Ageratina grandifolia*. A. Rama con puntos oscuros (tomada de Hinojosa-Espinosa *et al.*, 2019). B. Flores (tomado por A. Gutiérrez). C. Hoja ovada-deltaide, con base serrada decurrente (tomado por A. Vásquez). D. *A. grandifolia* creciendo en Capulálpam de Méndez, Oaxaca (tomado por A. Vásquez).

Su distribución se sitúa en los bosques húmedos bajos de los estados de Michoacán, Estado de México, Morelos, Ciudad de México, Hidalgo, Guerrero y Oaxaca, y es empleada tradicionalmente contra malestares estomacales y afecciones de la piel (Hinojosa *et al.*, 2019).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus tipo II se ha convertido en una pandemia y representa uno de los mayores retos en materia de salud a nivel mundial, con un grave impacto económico. De acuerdo con la Federación Internacional de la Diabetes, existen alrededor de 463 millones de pacientes a nivel mundial y aproximadamente 4 millones de personas entre 20 y 79 años murieron de diabetes en 2019, convirtiéndola en una de las 10 principales causas de muerte. México ocupa el sexto lugar a nivel mundial de número de pacientes diabéticos, con alrededor de 8.6 millones de casos diagnosticados. Nuestro país enfrenta diversos problemas que limitan la eficacia en la contención de esta enfermedad, entre los que se incluyen la falta de recursos económicos y limitado acceso a servicios de salud.

Dentro de las opciones farmacológicas empleadas en la actualidad para el tratamiento de la DMT2, se encuentran los inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas, que logran una disminución de la absorción de glucosa sin correr el riesgo de una hipoglucemia; sin embargo, presentan serios efectos secundarios gastrointestinales, además de la necesidad de una dosificación frecuente a lo largo del día, aunado a un costo mediano. Por esto resulta justificado el interés en el estudio de la especie *Ageratina grandifolia* como una posible fuente de inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas más eficaces y con menos efectos adversos, para el desarrollo de nuevos fármacos o de remedios herbolarios útiles.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 General

Descubrir nuevos inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas a partir de la especie *Ageratina grandifolia* con el propósito de contribuir al desarrollo de nuevos agentes antidiabéticos.

### 3.2 Particulares

- a) Evaluar la actividad inhibitoria de los extractos, aceite esencial y metabolitos puros aislados de la planta sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas mediante un ensayo *in vitro*.
- b) Caracterizar los metabolitos aislados mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- c) Establecer la composición química del aceite esencial mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

## 4. HIPÓTESIS

El uso tradicional de otras especies del género *Ageratina*, así como consideraciones de tipo quimiotaxonómico sugieren que *Ageratina grandifolia* posee metabolitos secundarios que pueden ser empleados como inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Material vegetal

Las partes aéreas de *Ageratina grandifolia* fueron colectadas en Capulálpam de Méndez, Oaxaca, por la Dra. Araceli Vásquez Pérez en enero y julio del año 2019. La identificación corrió a cargo del M. en C. Rafael Torres Colín. Una muestra de referencia se encuentra en el Herbario Nacional (MEXU) con número de voucher 1502275.

### 5.2 Obtención de la infusión de *A. grandifolia*

La infusión se preparó a partir de 9 g de material vegetal seco y molido en contacto con 300 mL de agua destilada hirviendo por 30 min, posterior a esto, la infusión resultante se filtró y enfrió a temperatura ambiente.

### 5.3 Aislamiento de metabolitos secundarios de *A. grandifolia*

#### 5.3.1 Obtención de las fracciones orgánicas de la infusión

El fraccionamiento se llevó a cabo mediante extracciones líquido-líquido (repartos) empleando como disolventes orgánicos  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt. En un embudo de separación se colocaron 300 mL de la infusión con 300 mL del respectivo disolvente orgánico. La fracción orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y finalmente se concentró en un rotavapor; este procedimiento fue repetido en 3 ocasiones empleando el mismo disolvente. El rendimiento de la fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fue de 30 mg (0.33 %), mientras que el de la fracción de AcOEt fue de 120 mg (1.33 %). Este procedimiento se repitió hasta la obtención de 0.5 g y 3 g de los extractos de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt respectivamente.

#### 5.3.2 Aislamiento de los metabolitos secundarios de la fracción de $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

La fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (500 mg) se sometió a una CCA sobre gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  con polaridad creciente, obteniéndose un total de 227 fracciones, las cuales se reunieron de acuerdo con lo observado en CCF (**Tabla 3**). De este proceso se aislaron los compuestos **23** (2.8 mg), **24** (74.1 mg) y **32** (9.8 mg).

**Tabla 3.** Reunión de fracciones de la columna de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Fracciones combinadas	Polaridad empleada en la columna	Peso (mg)	Compuesto aislado
1-8	95:5 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) → 85:15 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	0.4	
21-59	85:15 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) → 75:25 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	8.3	
60-79	75:25 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) → 65:35 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	5.6	
80-93	65:35 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) → 60:40 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	4.7	
94-99	60:40 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	10.7	
100-101	60:40 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	2.8	<b>23</b>
102-118	60:40 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) → 50:50 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	10.3	
119-120	50:50 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	5.3	
121-123	50:50 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	9.8	<b>32</b>
124-128	50:50 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	5.3	
129-147	50:50 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) → 40:60 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	14.9	
148-159	40:60 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	74.1	<b>24</b>
160-174	40:60 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	42.1	
175-206	40:60 (Hex/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) → 100 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	21.5	
207-227	100 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) → 95:5 (CHCl <sub>2</sub> /MeOH)	4.2	

Desmetoxiencalinalina (**23**): Aceite amarillo; EM-IE, *m/z*: 202 [M]<sup>+</sup>, 187 (100) [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>. IR (FT-IR)  $\nu_{\max}$  2975, 1672, 1596, 1268 cm<sup>-1</sup>. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 7.74 (1H, dd, *J*=8.4, 2.2 Hz, H-7), 7.61 (1H, d, *J*=2.3 Hz, H-5), 6.78 (1 H, d, *J*=8.4 Hz, H-8), 6.35 (1H, d, *J*=9.9 Hz, H-4), 5.66 (1H, d, *J*=9.9 Hz, H-3), 2.52 (3H, s, H-12), 1.45 (3H, s, H-9, 10), 1.45 (3H, s, H-10). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 196.93 (C-11), 157.55 (C-8a), 131.3 (C-3), 130.43 (C-6), 130.36 (C-7), 127.01 (C-5), 121.79 (C-4), 120.76 (C-4a), 116.23 (C-8), 77.66 (C-2), 28.5 (C-9), 28.5 (C-10), 26.41 (C-12).

Encecalinalol (**24**): Aceite anaranjado; EM-IE *m/z*: 234 [M]<sup>+</sup>, 219 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 201 (100) [M-CH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. IR (FT-IR)  $\nu_{\max}$  3402, 2971, 1617, 1125 cm<sup>-1</sup>. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 6.93 (1 H, s, H-5), 6.35 (1H, s, H-8), 6.25 (1H, d, *J*=9.7 Hz, H-4), 5.66 (1 H, d, *J*=9.9 Hz, H-3), 5 (1 H, m, H-11), 3.79 (3 H, s, H-13), 1.45 (3H, d, *J*=6.5 Hz, H-12), 1.4 (3H, s, H-9), 1.4 (3H, s, H-10). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 157.38 (C-7), 153.12 (C-8a), 127.79 (C-3), 125.65 (C-7), 123.93 (C-5), 121.87 (C-4), 114.21 (C-4a), 99.58 (C-8), 76.44 (C-2), 65.76 (C-11), 55.44 (C-13), 28 (C-10), 27.98 (C-9), 22.74 (C-12).

Encecalina (**32**): Aceite amarillo; EM-IE  $m/z$ : 232  $[M]^+$ , 217 (100)  $[M-CH_3]^+$ . IR (FT-IR)  $\nu_{\max}$  2925, 1740, 1663, 1605, 1282, 1148  $\text{cm}^{-1}$ . RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7.52 (1H, s, H-5), 6.37 (1H, s, H-8), 6.29 (1H, d,  $J=9.7$  Hz, H-4), 5.51 (1H, d,  $J=9.7$  Hz, H-3), 3.86 (1H, s, H-13), 2.55 (3H, s, H-12), 1.43 (3H, s, H-9), 1.43 (3H, s, H-10). RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 197.77 (C-11), 158.66 (C-8a), 129.16 (C-5), 120.74 (C-6), 161.23 (C-7), 99.72 (C-8), 128.48 (C-3), 121.48 (C-4), 114.05 (C-4a), 77.81 (C-2) 55.7 (C-13), 32.03 (C-12), 28.5 (C-9), 28.5 (C-10).

### 5.3.3 Aislamiento de los metabolitos secundarios de la fracción de AcOEt

La fracción de AcOEt (3 g) se sometió a una CCA sobre Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich-Fluka) empleando MeOH como eluyente (**Tabla 4**). Al disolver la fracción en MeOH para aplicar la muestra en la columna precipitó el compuesto **105** (18.4 mg); las fracciones 120-142 permitieron identificar al compuesto **106** (9 mg). Las fracciones 110-119 fueron sometidas a una CCA sobre Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich-Fluka) empleando como eluyente una mezcla de acetona/MeOH (8:2) para dar el compuesto **107** (3.1 mg). Las fracciones 26-32 se sometieron a un fraccionamiento posterior.

**Tabla 4.** Reunión de fracciones de la columna de la fracción de AcOEt

Fracciones combinadas	Peso (mg)	Compuesto aislado
1-11	3.4	
12-16	9.5	
17-20	33.5	
21-25	647.4	
26-32	589.7	
33-35	5.7	
36-44	31.4	
45-67	58.9	
68-73	15.1	
74-80	20.3	
81-109	24.1	
110-119	10.5	<b>107</b>
120-142	9	<b>106</b>

Quercetagetina 7-*O*- $\beta$ -D-glucósido (**105**): Sólido amarillo; EM-ESI (modo negativo)  $m/z$ : 479.63  $[M-H]^-$ . IR (FT-IR)  $\nu_{\max}$  3266, 1658  $\text{cm}^{-1}$ . RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 7.69 (1H, d,

$J=2.2$ , H-2''), 7.51 (1H, dd,  $J=8.5$ , 2.2 Hz, H-6'), 6.91 (1H, s, H-8), 6.88 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-5'), 5.01 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, H-1''), 3.20-3.49 (sin resolver, m, H-2'''-H-6a'''), 3.75 (1H, m, H-6b''). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 176.15 (C-4), 151.59 (C-7), 148.15 (C-8a), 147.82 (C-4'), 147.51 (C-2), 145.36 (C-5), 145.06 (C-3'), 135.64 (C-3), 129.64 (C-6), 122.05 (C-1'), 119.95 (C-6'), 115.58 (C-5'), 115.48 (C-5'), 115.40 (C-2'), 105.13 (C-4a), 100.92 (C-1''), 93.58 (C-8), 77.3 (C-5''), 75.81 (C-3''), 73.22 (C-2''), 69.67 (C-4''), 60.65 (C-6'').

Quercetagetina-7-*O*-(6-*O*-cafeoil- $\beta$ -D-glucopiranosido) (**106**): Sólido amarillo; EM-ESI (modo negativo)  $m/z$ : 641.71 [M-H]<sup>-</sup>. IR (FT-IR)  $\nu_{\max}$  3291, 1659, 1596 cm<sup>-1</sup>. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  (ppm) 7.71 (1H, d,  $J=2.2$  Hz, H-2'), 7.59 (1H, dd,  $J=8.5$  Hz, 2.2, H-6'), 7.43 (1H, d,  $J=15.8$  Hz, H-7'''), 6.82 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-5'), 6.78 (1H, s, H-8), 6.73 (1H, d,  $J=1.93$  Hz, H-2'''), 6.56 (1H, dd,  $J=8.2$ , 1.93 Hz, H-6'''), 6.52 (1H, d,  $J=8.2$  Hz, H-5'''), 6.17 (1H, d,  $J=15.8$  Hz, H-8'''), 5.08 (1H, d,  $J=7.22$  Hz, H-1''), 4.65 (1H, dd,  $J=11.98$ , 2.48 Hz, H-6a'), 4.33 (1H, dd,  $J=11.96$ , 7.11 Hz, H-6b''), 3.86 (1H, ddd,  $J=9.65$ , 7.13, 2.53 Hz, H-5''), 3.63 (1H, m, H-2''), 3.59 (1H, m, H-3''), 3.47 (1H, t,  $J=9.03$  Hz, H-4'). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) 175.93 (C-4), 167.69 (C-9'''), 151.16 (C-7), 148.75 (C-8a), 147.92 (C-4'''), 147.4 (C-2), 147.4 (C-4'), 146.19 (C-7'''), 145.42 (C-5), 145.02 (C-3'''), 144.62 (C-3'), 135.76 (C-3), 129.33 (C-6), 125.9 (C-1'''), 122.64 (C-1'), 120.8 (C-6''') 120.45 (C-6'), 115.0 (C-5'''), 114.73 (C-2'), 114.71 (C-5'), 114.18 (C-2'''), 112.96 (C-8'''), 105.14 (C-4a), 100.58 (C-1''), 93.46 (C-8), 75.93 (C-3''), 74.10 (C-5''), 73.02 (C-2''), 70.60 (C-4''), 63.16 (C-6'').

6-Hidroxikaempferol-7-*O*-(6-*O*-cafeoil- $\beta$ -D-glucopiranosido) (**107**): Sólido amarillo; EM-ESI (modo negativo)  $m/z$ : 625.33 [M-H]<sup>-</sup>. IR (FT-IR)  $\nu_{\max}$  3331, 1696, 1597, 1177 cm<sup>-1</sup>. UV:  $\lambda_{\max}$  276.76, 334.76 nm. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  (ppm) 8.01 (2H, d,  $J=8.84$  Hz, H-2', C-H'), 7.41 (1H, d,  $J=15.8$ , H-7'''), 6.82 (1H, s, H-8), 6.81 (2H, d,  $J=8.93$  Hz, H-3', H-5'), 6.69 (1H, d,  $J=2$  Hz, H-2'''), 6.52 (1H, dd,  $J=8.3$ , 2 Hz, H-6'''), 6.50 (1H, d,  $J=8.3$ , Hz, H-5'''), 6.13 (1H, d,  $J=15.9$  Hz, H-8'''), 5.07 (1H, d,  $J=7.56$  Hz, H-1''), 4.67 (1H, dd,  $J=12.04$ , 2.53 Hz, H-6a'), 4.27 (1H, dd,  $J=11.94$ , 7.28 Hz, H-6b''), 3.85 (1H, m, H-5''), 3.61 (1H, m, H-2''), 3.54 (1H, t,  $J=9.06$  Hz, H-3''), 3.43 (1H, t,  $J=9.23$  Hz, H-4'). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) 176.35 (C-4), 167.65 (C-9'''), 159.24 (C-4'), 151.3 (C-7), 148.12 (C-8a), 148.09 (C-4''), 147.71 (C-2), 146.25 (C-7'''), 145.21 (C-5), 145.20 (C-3''), 135.81 (C-3), 129.56 (C-6), 129.47 (C-2', C-6'), 126.02 (C-1'''), 122.33 (C-1'), 121.0 (C-6'''), 115.10 (C-5'''), 114.9 (C-3', C-5'), 114.13 (C-2'''), 113.20 (C-8'''), 105.33 (C-4a), 100.72 (C-1''), 93.7 (C-8), 76.08 (C-3''), 74.27 (C-5''), 73.21 (C-2''), 70.78 (C-4''), 63.28 (C-6'').

### 5.3.3.1 Aislamiento del metabolito secundarios de las fracciones 26-32

La fracción combinada 26-32 (550 mg) de la columna que se describió en el apartado 5.3.3, se sometió a una CCA sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla de hexano/ $\text{CHCl}_3$  con polaridad creciente. De este proceso se obtuvieron 132 fracciones (**Tabla 5**). Las fracciones combinadas 37-50 se identificaron como el compuesto **25** (53.1 mg). Las fracciones combinadas 99-103 (103 mg) de la misma columna (sección 4.3.3) se sometieron a una CCA sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla de hexano/ $\text{CHCl}_3$ /MeOH con polaridad creciente, para dar el compuesto **108** (5.3 mg).

**Tabla 5.** Reunión de fracciones de la columna de las fracciones 26-32 de la fracción de AcOEt

Fracciones combinadas	Polaridad empleada en la columna	Peso (mg)	Compuesto aislado
1-36	100 (Hex) $\rightarrow$ 85:15 (Hex/ $\text{CHCl}_3$ )	12.5	
37-50	85:15 (Hex/ $\text{CHCl}_3$ )	53,1	<b>25</b>
51-62	85:15 (Hex/ $\text{CHCl}_3$ ) $\rightarrow$ 80:20 (Hex/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )	34.2	
63-72	80:20 (Hex/ $\text{CHCl}_3$ ) $\rightarrow$ 70:30 (Hex/ $\text{CHCl}_3$ )	45.8	
73-80	70:30 (Hex/ $\text{CHCl}_3$ ) $\rightarrow$ 60:40 (Hex/ $\text{CHCl}_3$ )	38.1	
81-86	60:40 (Hex/ $\text{CHCl}_3$ )	15.4	
87-98	60:40 (Hex/ $\text{CHCl}_3$ ) $\rightarrow$ 30:70 (Hex/ $\text{CHCl}_3$ )	26.7	
99-103	30:70 (Hex/ $\text{CHCl}_3$ ) $\rightarrow$ 15:85 (Hex/ $\text{CHCl}_3$ )	104.5	<b>108</b>
104-107	15:85 (Hex/ $\text{CHCl}_3$ ) $\rightarrow$ 100 ( $\text{CHCl}_3$ )	12.3	
108-124	100 ( $\text{CHCl}_3$ ) $\rightarrow$ 95:5 ( $\text{CHCl}_3$ /MeOH)	3.2	
125-132	95:5 ( $\text{CHCl}_3$ /MeOH) $\rightarrow$ 85:15 ( $\text{CHCl}_3$ /MeOH)	3.4	

*O*-metilencecalinol (**25**): Aceite amarillo; EM-IE  $m/z$ : 248  $[\text{M}]^+$ , 233  $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ , 201 (100)  $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{OH}-\text{CH}_3]^+$ . IR (FT-IR)  $\nu_{\text{max}}$  2972, 1615, 1124  $\text{cm}^{-1}$ . RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6.96 (1H, s, H-5), 6.34 (1H, s, H-8), 6.28 (1H, d,  $J=9.8$  Hz, H-4), 5.45 (1H, d,  $J=9.8$  Hz, H-3), 4.63 (1H, q,  $J=6.4$  Hz, H-11), 3.76 (3H, s, H-13), 3.23 (3H, s, H-14), 1.42 (6H, s, H-9, H-10), 1.35 (3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-12). RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 157.5 (C-7), 153.04 (C-8a), 127.55 (C-3), 123.83 (C-5), 123.73 (C-6), 122.06 (C-4), 113.97 (C-4a), 99.25 (C-8), 76.83 (C-2), 72.75 (C-11), 56.40 (C-14), 55.42 (C-13), 28.10 (C-9), 28.04 (C-10), 22.4 (C-12).

4-Hidroxi-3-((*S*)-1'angeloiloxi-(*R*)-2',3'-epoxi-3'-metil)butilacetofenona (**108**): Aceite naranja; EM-ESI (modo positivo)  $m/z$ : 341.27 [M+Na]<sup>+</sup> 319.26 [M+H]<sup>+</sup>. IR (FT-IR)  $\nu_{\max}$  3437.81, 1714, 1678, 1605, 1264 cm<sup>-1</sup>. UV  $\lambda_{\max}$  226.76, 272.76 nm. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) y RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) se encuentran en la tabla 8.

## 5.4 Cálculos computacionales

Las estructuras de mínima energía de los diferentes diastereoisómeros fueron construidas utilizando el programa Spartan'10 (Wavefunction Inc., Irvine, CA, EUA). La búsqueda conformacional se llevó a cabo utilizando un protocolo Monte Carlo y el campo de fuerza molecular de Merck (MMFF94, por sus siglas en inglés Merck Molecular Force Field 94). Los conformeros con una barrera de energía de 5 kcal/mol se sometieron al cálculo de optimización de geometría con el programa Gaussian 09 (Gaussian Inc Wallingford, CT, EUA) empleando el nivel de teoría DFT B3LYP/6-31G(d) y las constantes de protección de RMN fueron calculadas con el método GIAO (Gauge-Independent Atomic Orbital) con los niveles mPW1PW91/6-31+G(d,p) y B3LYP/6-31+G(d,p) usando el modelo de solvente PCM en CHCl<sub>3</sub>. Las constantes de acoplamiento,  $J$ , se calcularon considerando solo la interacción de contacto de Fermi (FC) en el nivel B3LYP/6-31G(d,p) empleando el método GIAO. Los datos experimentales y calculados se analizaron por métodos de probabilidad DP4+ y  $J$ -DP4 empleando los archivos de Excel provistos por Grimblat et al., (2019) en sarotti-NMR.weebly.com.

Todos los cálculos se llevaron a cabo en el clúster de supercómputo Mitzli de la UNAM, ubicada en la Dirección de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC) y pertenece al Laboratorio Nacional de Cómputo de Alto Desempeño (LANCAD). Está conformado por 332 nodos de cómputo HP Proliant SL230 y SL250, cuenta con 8440 núcleos de procesamiento Intel, 16 tarjetas NVIDIA, una memoria total de 47 TB, un sistema de almacenamiento masivo de 750 TB y sistema operativo LINUX RedHat con rendimiento teórico de 232 TFlop/s.

## 5.5 Aislamiento del aceite esencial

Treinta gramos de las partes aéreas de *A. grandifolia* en 1 L de agua destilada se sometieron a hidrodestilación por 2 horas. El hidrodestilado resultante se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 300), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y concentrado con vacío, para dar un total de 200 mg de aceite esencial (0.7 %). El aceite esencial se almacenó en viales ámbar a 4°C hasta su análisis por cromatografía de gases.

### 5.5.1 Aislamiento del compuesto 26 a partir del aceite esencial

300  $\mu$ L del aceite esencial fueron aplicados sobre una placa de CCF preparativa, se empleó como eluyente una mezcla de hexano/tolueno/AcOEt (5:4:1), una vez concluida la elución se extrajo la banda de interés vía maceración con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  por 24 horas. Para obtener el producto se separó la sílice por filtración y la solución resultante se concentró al vacío, este proceso permitió obtener el compuesto **26** (1.3 mg).

Androencecalinol (**26**): Aceite amarillo; EM-IE m/z: 216  $[\text{M}]^+$ , 201  $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ . RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7.07 (1H, s H-5), 6.91 (1H, dd,  $J=17.7$ , 11.14 Hz, H-11), 6.34 (1H, s, H-8), 6.27 (1H, d,  $J=9.76$  Hz, H-4), 5.57 (1H, dd,  $J=17.73$ , 1.6 Hz, H-12a), 5.47 (1H, d,  $J=9.76$  Hz, H-3), 5.10 (1H, dd,  $J=11.16$ , 1.57 Hz, H-12b), 3.79 (3H, s, H-13), 1.41 (6H, s, H-9, H-10).

### 5.6 Instrumentación y condiciones cromatográficas para el análisis del aceite esencial.

El análisis de CG se realizó empleando un cromatógrafo de gases Agilent 6890 N, acoplado con un detector de masas LECO Pegasus 4 (MS- TOF) con un voltaje de ionización de 70 eV. Se empleó una columna capilar de sílice fundida de 5%-fenil-metilpolisiloxano DB-5 (20 m x 0.18 mm D.I., 0.18  $\mu\text{m}$  grosor de la película). La temperatura inicial del horno fue de 40  $^\circ\text{C}$ , se mantuvo por 3 min, y después se incrementó a una velocidad de 20  $^\circ\text{C}$  por min, hasta alcanzar 300  $^\circ\text{C}$ , esto se mantuvo por 15 min. La temperatura del inyector y de la línea de transferencia fueron de 300 y 250  $^\circ\text{C}$ , respectivamente. El gas acarreador fue helio con un flujo de 1 mL/min. La muestra fue inyectada usando un radio de Split de 1:50.

La identificación de los picos se realizó mediante la comparación de sus datos espectrales de masas con la Biblioteca de espectros de masas del National Institute of Standards and Technology (NIST 98) y mediante la comparación con los índices de retención y con muestras auténticas.

### 5.7 Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*

Para la evaluación de la inhibición enzimática de los extractos y los compuestos puros, se empleó la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), la enzima se preparó a una concentración de 1 U/mL en una solución amortiguadora de fostatos (SBF, 100 mM, pH 7).

Las muestras para evaluar se disolvieron en MeOH o en SBF a concentraciones de 10000 ppm para extractos, 5000 ppm para fracciones y 10 mM para compuestos puros. Como control positivo, se empleó acarbosa (30 mM) disuelta en SBF. Como sustrato se utilizó  $\alpha$ -D-glucopiranosido de *p*-nitrofenilo (*p*-NPG, 5 mM) disuelto en SBF. Las evaluaciones se llevaron a cabo en placas de Elisa de 96 pozos. Las absorbancias se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro BioRad modelo iMark (Hercules, CA, EUA) a una longitud de onda de 405 nm utilizando el software Microplate Manager 6 (versión 6.3, BioRad, Hercules, CA, EUA). Las muestras se evaluaron por triplicado utilizando alícuotas de 0-10  $\mu$ L de las muestras, con 20  $\mu$ L de la solución de enzima (1 U/mL) y el volumen necesario de SBF para obtener un volumen de 90  $\mu$ L; éstas fueron incubadas durante 10 min a 37° C. Una vez transcurrido este periodo, se adicionó a cada pozo 10  $\mu$ L de sustrato (*p*-NPG) e inmediatamente después se registró la absorbancia al tiempo cero ( $T_i$ ) y se incubó nuevamente a 37° C por 20 min. Al concluir este tiempo se registró la absorbancia al tiempo final ( $T_f$ ). La actividad inhibitoria se determinó como el porcentaje al comparar los valores registrados de las muestras con el blanco (SBF), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \alpha GHY = \left( 1 - \frac{A_{405c}}{A_{405b}} \right) \times 100\%$$

Donde % $\alpha$ GHY es el porcentaje de inhibición,  $A_{45c}$  es la absorbancia corregida de la muestra ensayada ( $A_{\text{final}} - A_{\text{inicial}}$ ) y  $A_{405b}$  es la absorbancia del blanco ( $A_{\text{blanco final}} - A_{\text{blanco inicial}}$ ). El valor de la concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) se calculó por análisis de regresión, empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{100}}{1 + \left( \frac{I}{IC_{50}} \right)^s}$$

Donde  $A_{100}$  es la inhibición máxima, I es la concentración del inhibidor,  $IC_{50}$  es la concentración requerida para inhibir la actividad de la enzima en un 50 %, y s es el grado de cooperatividad.

## 5.8 Cinética enzimática del compuesto 106

Para la evaluación de la cinética enzimática del compuesto **106**, se empleó la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), para la enzima se preparó una solución con una concentración de 1 U/mL en una solución amortiguadora de fostatos (SBF, 100 mM, pH 7).

El compuesto **106** se disolvió en MeOH a una concentración de 0.01 mM. Como sustrato se utilizó  $\alpha$ -D-glucopiranosido de *p*-nitrofenilo (*p*-NPG, 20 mM) disuelto en SBF. Las evaluaciones se llevaron a cabo en placas de Elisa de 96 pozos. Las absorbancias se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro BioRad modelo iMark (Hercules, CA, EUA) a una longitud de onda de 405 nm utilizando el software Microplate Manager 6 (versión 6.3, BioRad, Hercules, CA, EUA). Para obtener la curva de saturación por sustrato de la enzima, se prepararon las muestras por triplicado utilizando alícuotas de 0-10  $\mu$ /mL del sustrato (*p*-NPG), con 20  $\mu$ L de la solución de la enzima (1 U/mL) y el volumen necesario de SBF para obtener un volumen de 100  $\mu$ L; inmediatamente después se registró la absorbancia al tiempo cero ( $T_i$ ) y se incubó a 37° C por 20 min. Al concluir este tiempo se registró la absorbancia al tiempo final ( $T_f$ ). Posteriormente, se realizó nuevamente el experimento anterior empleando concentraciones de 0.7, 0.85 y 0.9 mM del inhibidor (**106**).

El tipo de inhibición enzimática se determinó mediante un análisis de regresión no lineal, empleando el programa GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, California, EUA). El análisis gráfico se realizó construyendo la curva de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk, graficando el inverso de la diferencia de las absorbancias ( $T_f - T_i$ ) como función del inverso de la concentración de sustrato y realizando un ajuste lineal para el conjunto de rectas obtenidas.

## 5.8 Estudios de acoplamiento molecular

Las estructuras de mínima energía de los compuestos para los estudios de acoplamiento molecular (docking) fueron preparadas utilizando el programa AutoDock Tools package v1.5.6

La estructura de la  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* fue obtenida del “Protein Data Bank” con el código 3A4A. Para el receptor se mantuvo rígida la proteína, se agregaron los hidrógenos polares y las cargas de Kollman, se eliminaron las moléculas de agua y los parámetros de solvatación fueron los predeterminados. Para los metabolitos se agregaron cargas de Gasteiger, se determinaron los tipos de átomos, el número de enlaces de giro libre y se eliminaron los hidrógenos no polares. Los estudios de acoplamiento molecular se llevaron a cabo utilizando AutoDock. Primero se realizó un acoplamiento ciego para establecer el sitio probable de interacción de los metabolitos con las enzimas de estudio. El espacio de búsqueda para este estudio preliminar se definió con un tamaño de caja de 120 x 120 x 120 Å en las dimensiones *x*, *y* y *z*, centrada en la macromolécula y con un espaciado de cuadrícula de 0.65 Å. El estudio se llevó a cabo utilizando los parámetros preestablecidos en el programa, aumentando el número de corridas a 100, utilizando un algoritmo genético Lamarckiano. Posteriormente, se realizó un refinamiento al utilizar un tamaño de caja

menor (50 x 50 x 50 Å y un espaciado de cuadrícula de 0.375 Å), centrada en la posición de menor energía del ligando, obtenida del estudio de acoplamiento molecular ciego realizado previamente.

Se analizaron las interacciones de los complejos ligando-macromolécula de menor energía. Las representaciones en 2D y 3D de los sitios predichos de unión, se llevaron a cabo utilizando los programas PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System v.1.7.4, Schrödinger, Nueva York, EUA) y LigPlot+ (EMBL-EBI, Cambridgeshire, Inglaterra).

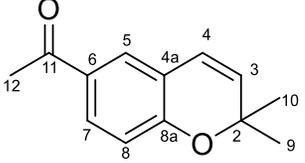
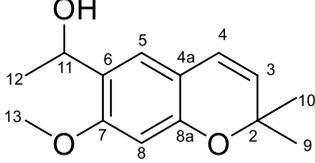
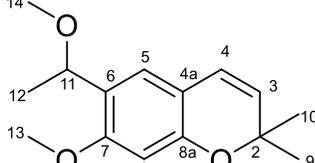
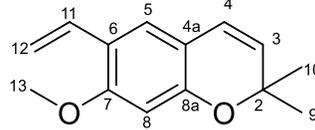
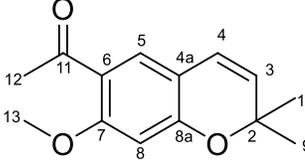
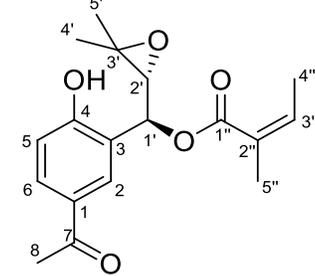
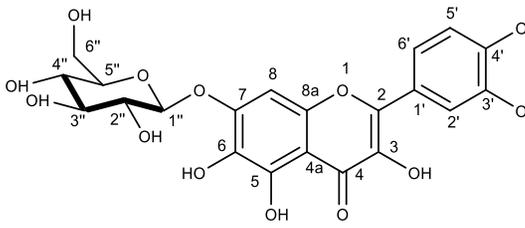
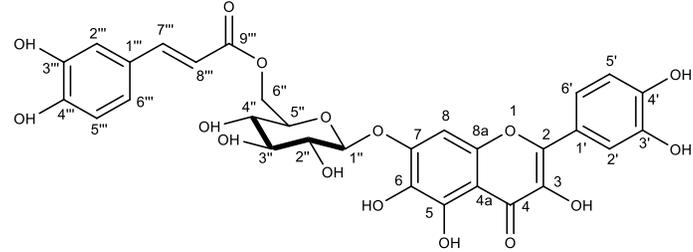
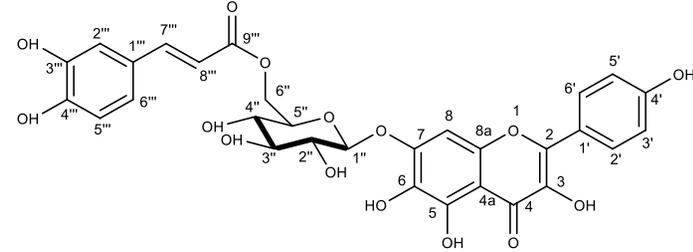
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como parte de un programa encaminado al descubrimiento de nuevos inhibidores de alfa-glucosidasas se comprobó que la infusión y el aceite esencial de *Ageratina grandifolia* inhiben la actividad de la enzima de manera significativa. La planta se seleccionó con base en un criterio quimiotaxonómico ya que en estudios previos se comprobó que otras especies del género contienen principios hipoglucemiantes (Bustos Brito *et al.*, 2016)

Con el propósito de obtener los principios activos el extracto acuoso se procesó por métodos de reparto y cromatográficos. Así, el fraccionamiento inicial por repartos con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOEt generó dos fracciones primarias. Posteriormente, mediante cromatografías sucesivas de estas fracciones en columna abierta sobre gel de sílice y/o dextrano se aislaron los siguientes productos naturales: cuatro cromenos, desmetoxiencecalina (**23**), enecalinalol (**24**), *O*-metilencecalinalol (**25**) y enecalina (**32**), además de los flavonoides quercetagetina-7-*O*-β-D-glucósido (**105**), quercetagetina-7-*O*-(6-*O*-cafeoil-β-D-glucopiranosido) (**106**), 6-hidroxikaempferol-7-*O*-(6-*O*-cafeoil-β-D-glucopiranosido) (**107**), y una *p*-hidroxiacetofenona (**108**) [Tabla 6]. Todos los compuestos se caracterizaron mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos. En el caso de los compuestos conocidos, la identificación se corroboró por comparación de los parámetros físicos y espectroscópicos con los descritos previamente en la literatura. Para el compuesto **108** fue necesario complementar el análisis de los espectros con cálculos computacionales de los desplazamiento químicos de los posibles diastereoisómeros por el método GIAO con niveles mPW1PW91/6-311+G(d,p) y B3LYP/6-31G+(d,p).

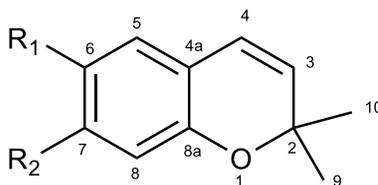
Los constituyentes del aceite esencial se caracterizaron mediante la comparación de sus datos espectrales de masas con los de la biblioteca del National Institute of Standards and Technology (NIST 98) y de sus índices de retención. A partir del aceite esencial fue posible aislar otro cromeno caracterizado como androencecalinalol (**26**). Su elucidación estructural se discutirá junto con los otros cromenos aislados de la planta por su similitud estructural

**Tabla 6.** Compuestos aislados a partir de *A. grandifolia*

			
<p align="center"><b>23</b></p>	<p align="center"><b>24</b></p>	<p align="center"><b>25</b></p>	<p align="center"><b>26</b></p>
			
<p align="center"><b>32</b></p>	<p align="center"><b>108</b></p>	<p align="center"><b>105</b></p>	
			
<p align="center"><b>106</b></p>		<p align="center"><b>107</b></p>	

## 6.1 Caracterización de los cromenos 23-26 y 32

Los datos espectroscópicos de RMN 1D y 2D de **23-26** y **32** fueron consistentes con la estructura base de los 2,2-dimetilcromenos (**Figura 7**). La presencia de todos estos metabolitos se encuentra muy bien documentada dentro del género, y en general, en la familia Asteraceae (Proksch y Rodríguez, 1983; Fang *et al.*, 1988; González *et al.*, 1989; Aguilar Guadarrama *et al.*, 2009; *inter alia*). Así, los espectros de RMN (**Figuras S5-S15, S26, anexo**) presentan las señales diagnósticas del núcleo 2,2-dimetil-2*H*-cromeno mono- o disustituidos en las posiciones C-6, o C-6 y C-7, respectivamente. Las más importantes se resumen a continuación: alrededor de  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}} \sim 1.4$  (s, 6H, H-9, H-10) /  $\sim 28$  (C-9, C-10) y aproximadamente en  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}} \sim 5.5$  (d, 1H,  $J = 9.8$  Hz, H-3) /  $\sim 128$  (C-3) y  $\sim 6.3$  (d, 1H,  $J = 9.8$  Hz, H-4) /  $\sim 121$  (C-4) (Lima *et al.*, 2015). En los espectros de **24-26** y **32** se observaron las dos señales aromáticas [ $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}} \sim 7$  (s, 1H, H-5) /  $\sim 124$  (C-5);  $\sim 6.35$  (s, 1H, H-8) /  $\sim 99$  (C-8)] para derivados de 2,2-dimetil-2*H*-cromeno sustituidos en las posiciones C-6 y C-7. En cambio, el producto **23** presentó en la región aromática del espectro de RMN- $^1\text{H}$  un sistema ABX integrado por H-5 en 7.61 (d, 1H,  $J = 2.3$  Hz), H-7 en 7.74 (dd, 1H,  $J = 8.4, 2.2$  Hz) y H-8 en 6.78 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), típico de un 2,2-dimetil-2*H*-cromeno sustituido en C-6. Estas señales mostraron correlación en los espectros HSQC con los carbonos en  $\delta_{\text{C}}$  127.01, 130.36 y 116.23, respectivamente.



**Figura 7.** Estructura base de 2,2-dimetil-2*H*-cromeno

La diferencia fundamental entre todos los cromenos aislados radica en los sustituyentes de la posición 6. Los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  y RMN- $^1\text{H}$  de **23** y **32** presentan señales para una metilcetona; el grupo carbonilo se observó en los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  como una señal simple alrededor de 197 ppm; en tanto que el metilo se observó en  $\sim \delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}} 2.5$  (s, 3H, H-12) / 30 (C-12). Por otra parte, los productos **24** y **25** poseen un residuo de dos átomos de carbono que contiene un alcohol secundario y un metiléter de alcohol secundario, respectivamente. Las señales del metino oxigenado de ambos productos se observaron en los espectros de RMN- $^1\text{H}$  como cuartetos ( $J = 6.4$  Hz) en  $\delta_{\text{H}}$  5.0 (**24**) y 4.63 (**25**) las cuales mostraron correlación en el espectro HSQC con las señales en  $\delta_{\text{C}}$  65.76 y 72.75, respectivamente. Las señales de los metilos de estos residuos se observan en

$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  1.45 (d, 3H,  $J=6.5$  Hz, H-12) / 22.74 (C-12) para **24**, y 1.35 (d, 3H,  $J=6.4$  Hz, H-12) / 22.4 (C-12) en el caso de **25**. El producto **25** se ha aislado como un producto natural de varias especies (Fang *et al.*, 1988, González *et al.*, 1989), sin embargo, este podría ser un artefacto generado durante el fraccionamiento secundario de la fracción de AcOEt. El producto no se detectó en el extracto acuoso, ni en la fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Además, existen reportes como el de Lima *et al.* (2015), donde se informa sobre la formación de estos artefactos entre cromenos y alcoholes de cadena corta.

Finalmente, en el caso del producto **26**, el residuo C2 es de carácter vinílico. En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN se observa una señal doble de dobles en  $\delta_{\text{H}}$  6.91 (H-11) con valores de  $J$  de 17.7 y 11.4 Hz, correspondientes a acoplamientos *trans* y *cis*, respectivamente con un grupo  $\text{CH}_2$  vinílico vecinal. Las señales de este último se aprecian en  $\delta_{\text{H}}$  5.57 (dd,  $J=17.73, 1.6$  Hz, H-12a) y en  $\delta_{\text{H}}$  5.1 (dd,  $J=11.16, 1.57$ , H-12b) (Proksch y Rodríguez, 1983). La asignación de estas señales se corroboró mediante el análisis de los espectros HSQC. En el caso de los productos **24** y **25** resta medir la rotación óptica para corroborar la configuración absoluta en el centro estereogénico.

## 6.2 Caracterización de los flavonoides 105-107

Los espectros de RMN 1D y 2D revelaron que los compuestos **105-107** son flavonoides glicosilados, de tipo flavonol (**Figuras S17-S24, anexo**). En el caso de **105** y **106**, en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  se presentan señales características del núcleo de quercetagina, las cuales serán enunciadas a continuación: una señal alrededor de  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}} \sim 6.8$  (s, 1H, H-8) /  $\sim 93.5$  (C-8) y un sistema ABX en la región aromática [ $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}} \sim 7.7$  (d, 1H,  $J=2.2$  Hz, H-2') /  $\sim 115$  (C-2');  $\sim 6.8$  (d, 1H,  $J=8.5$  Hz, H-5') /  $\sim 115$  (C-5'),  $\sim 7.5$  (dd, 1H,  $J=8.5, 2.2$  Hz, H-6') /  $\sim 120$  (C-6')] (Rongtao *et al.*, 1997).

Los compuestos **106** y **107** también mostraron señales típicas de un residuo de ácido caféico:  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}} \sim 7.4$  (d, 1H,  $J=15.8$  Hz, H-7''') /  $\sim 146.2$  (C-7''');  $\sim 6.1$  (d, 1H,  $J=15.8$  Hz, H-8''') /  $\sim 113$  (C-8''') y un sistema ABX aromático integrado por H-2''' en  $\sim 6.7$  (d, 1H,  $J=2$  Hz), H-5''' en  $\sim 6.51$  (d, 1H,  $J=8.2$  Hz) y H-6''' en  $\sim 6.52$  (dd, 1H,  $J=8.2, 2$  Hz). Mediante los espectros de HMBC fue posible correlacionar la señal del carbonilo del éster  $\delta_{\text{C}} \sim 167$  (C-9''') con un protón del azúcar ( $\delta_{\text{H}} \sim 7.3$ , dd, 1H,  $J=11.9, 7.2$  Hz, H-6a'') estableciéndose así el punto de esterificación.

El compuesto **107** presenta las mismas señales de RMN que **106**, a excepción del cambio en el sistema ABX de **106**, por un sistema AA'BB' en el espectro de RMN- $^1\text{H}$ , típico de los derivados kaempferol (Parejo *et al.*, 2005). Estas señales y sus correspondientes carbonos se indican a

continuación:  $\delta_H/\delta_C$  8.0 (d, 2H,  $J=8.8$  Hz, H-2', H-6') / 129.5 (C-2', C-6'); 6.8 (d, 2H,  $J=8.9$  Hz, H-3', H-5') / 115 (C-3', C-5'). De tal manera que los compuestos se caracterizaron como quercetagetina-7-*O*- $\beta$ -D-glucósido (**105**), quercetagetina-7-*O*-(6-*O*-cafeoil- $\beta$ -D-glucopiranosido) (**106**) y 6-hidroxikaempferol-7-*O*-(6-*O*-cafeoil- $\beta$ -D-glucopiranosido) (**107**).

Esta clase de flavonoides glicosilados y acilados por derivados de ácidos cinámicos han sido aislados a partir de especies como *Tagetes minuta*, *Rhaponticum uniflorum*, *Gnaphalium uliginosum*, *Ageratina adenophora*, todas pertenecientes a la familia Asteraceae, lo que sugiere su distribución moderada dentro de esta familia (Shahzadi et al., 2015; Olennikov et al., 2019; Olennikov et al., 2015; Nair et al., 1993).

### 6.3 Caracterización de la *p*-hidroxiacetofenona **108**

El compuesto **108** fue aislado como un aceite anaranjado. Su fórmula molecular fue determinada por espectrometría de masas como  $C_{18}H_{22}O_5$ , con un IDH de 8. El espectro de IR mostró bandas características para grupos hidroxilo ( $3437\text{ cm}^{-1}$ ) y carbonilo ( $1714, 1678\text{ cm}^{-1}$ ).

El análisis de los espectros de RMN evidenciaron que el producto natural es una *p*-hidroxiacetofenona relacionada con los compuestos 3,5-bis[isopenten-2-il]-4-hidroxiacetofenona (**30**), 2-senecioil-4-acetilfenol (**44**) y la espeletona (**48**) aisladas de *A. arsenei*, *A. altissima* y *A. pichichensis*, respectivamente (Fang et al., 1988; Lee et al., 2009; Aguilar Guadarrama et al., 2009). Al igual que para los compuestos mencionados los espectros de RMN (Figuras 12 y 13) evidencian la presencia de un sistema aromático 1,3,4-trisustituido [ $\delta_H/\delta_C$  7.87 (d,  $J=1.7$  Hz, H-2/129.7 (C-2); 6.88 [d,  $J=8.58$  Hz, H-5/117.5 (C-5); 7.83 (dd,  $J=8.67, 2.1$  Hz, H-6/130.4 (C-6)] y una metilcetona [ $\delta_H/\delta_C$  2.51(s, H-8)/26.3 (C-8) y 196.4 (C-7)]. El carbono *ipso* a la metilcetona se observa en  $\delta_C$  130.4, y el carbono base de un fenol en  $\delta_C$  157.2. Todas estas evidencias permiten proponer la estructura parcial “a”.

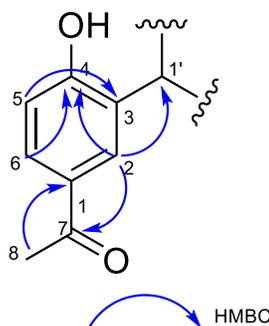
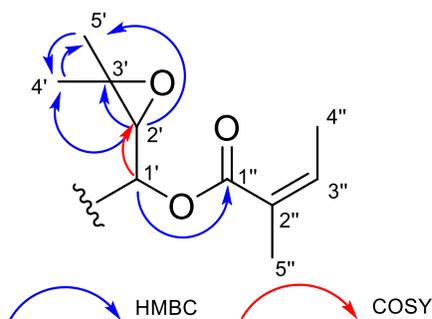


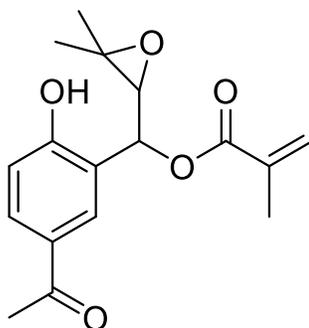
Figura 8. Estructura parcial ‘a’ con correlaciones HMBC

Al continuar con el análisis de los espectros se encuentran señales cuyo desplazamiento y multiplicidad son características para un residuo de ácido angélico [ $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  6.2 (qd,  $J=7.28$ , 1.49 Hz, H-3'')/141.3 (C-3''); 2.04 (dq,  $J=7.27$ , 1.56 Hz, H-4'')/16.1 (C-4''); 1.93 (p,  $J=1.55$  Hz, H-5'')/20.6 (C-5'');  $\delta_{\text{C}}$  169.4 (C-1'') y 126.7 (C-2'')], que constituyen la estructura parcial “b” (Joseph-Nathan *et al.*, 1984). Las estructuras parciales **a** y **b** satisfacen trece carbonos, cuatro oxígenos y catorce hidrógenos y siete de las insaturaciones requeridas por la fórmula molecular, restando por asignar uno o más fragmentos que sumen  $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}$  y una insaturación. Esta última debe corresponder a un ciclo ya que no se detectan otras señales aromáticas o vinílicas en los espectros. El análisis de los espectros COSY y HMBC permitió elucidar ese residuo, ‘c’, como se indica a continuación.



**Figura 9.** Estructuras parciales ‘b’ y ‘c’ con correlaciones HMBC y COSY

Los hidrógenos en  $\delta_{\text{H}}$  5.94 (d,  $J=7.57$  Hz, H-1') y 3.87 (d,  $J=3.7$  Hz, H-2') son vecinales y se encuentran unidos a carbonos base de oxígeno. Estas señales correlacionan en el espectro HSQC con los carbonos en  $\delta_{\text{C}}$  71.86 (C-1') y 74.2 (C-2'), respectivamente. Por otro lado, la señal en  $\delta_{\text{H}}$  5.94 (H-1') correlaciona con el carbonilo del residuo de ácido angélico, indicando así el punto de esterificación; en tanto que la señal en  $\delta_{\text{H}}$  3.87 (H-2') correlaciona con los carbonos de dos metilos geminales [ $\delta_{\text{C}}$  19.6 (C-4') y 25.9 (C-5')] ubicados sobre un carbono cuaternario en  $\delta_{\text{C}}$  79.6 (C-3'). Esta última información, en conjunto con la subestructura **b** permite integrar la estructura parcial **c**. Se propone el epóxido en virtud de los desplazamientos químicos de  $\delta_{\text{C}}$  74,2 (C-2') y  $\delta_{\text{C}}$  79.6 (C-3') y la necesidad de un ciclo adicional para satisfacer los requerimientos de la fórmula molecular. La correlación entre el hidrógeno en  $\delta_{\text{H}}$  5.94 (H-2) y la señal de carbono en  $\delta_{\text{C}}$  130.4 (C-1'), en el experimento HMBC permitió integrar las estructuras **a** y **c**, para general la estructura plana **d**, que contiene dos centros estereogénicos. Entonces la molécula debe corresponder a uno de los cuatro diastereoisómeros posibles.



**Figura 10.** Estructura 'd'

Con el propósito de discernir entre los cuatro diastereoisómeros se emplearon cálculos computacionales basados en métodos de química cuántica (Marcarino *et al.*, 2020). La correlación de los parámetros de RMN calculados usando cálculos de desplazamiento químico GIAO NMR de dos o más candidatos con los datos experimentales de RMN de un compuesto es la estrategia líder en la elucidación estructural asistida por computadora. Particularmente, el método de probabilidad DP4 se ha impuesto como un método popular para facilitar la asignación estereoquímica de moléculas orgánicas cuando se tienen disponibles los datos de RMN. Este método está basado en el hecho de que las diferencias entre los desplazamientos químicos calculados y experimentales obedecen una distribución *t*, por lo que el porcentaje de probabilidad de encontrar el isómero correcto, entre los propuestos, es alta. El método DP4+, desarrollado por Sarotti y su grupo de trabajo, representa una versión mejorada de DP4, de tal forma que, mediante la introducción de cambios significativos, incluyendo un aumento en los niveles de teoría empleados y el uso de desplazamientos químicos sin escala, con estas modificaciones, se logró una mejora significativa en el rendimiento general, proporcionando resultados precisos y confiables en el establecimiento de la estereoquímica de muchos compuestos, principalmente de productos naturales (Grimblat *et al.*, 2015; Marcarino *et al.*, 2020).

Debido a que los métodos probabilísticos DP4/DP4+ sólo se incluye el análisis Bayesiano asociado con los errores en los desplazamientos químicos, también se desarrolló una variante más rápida, llamada J-DP4, pensado para incluir la valiosa información brindada por las constantes de acoplamiento de protones vecinales ( $^3J_{\text{HH}}$ ) (Grimblat *et al.*, 2019; Marcarino *et al.*, 2020).

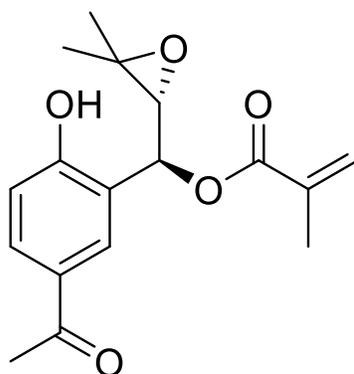
Para definir la configuración absoluta de los centros estereogénicos de C-1' y C-2', se realizaron predicciones computacionales de los desplazamientos químicos para los cuatro posibles diastereoisómeros (1'*R*,2'*R*; 1'*R*,2'*S*; 1'*S*,2'*R*; 1'*S*,2'*S*) usando el método NMR GIAO en los niveles mPW1PW91/6-311+G(d,p) and B3LYP/6-31G+(d,p) con un modelo de conductor polarizable

(PCM) en  $\text{CHCl}_3$  (Marcarino *et al.*, 2020; Grimblat *et al.*, 2015). Se calcularon los tensores isotrópicos para cada diastereoisómero y tras el análisis estadístico DP4+, se obtuvo, con el nivel B3LYP/6-31G+(d, p), que el diastereoisómero 1'S,2'R era el más probable con un 100 % de probabilidad. Estos resultados fueron respaldados por el análisis conjunto de probabilidad J-DP4, que combina las constantes  $^3J_{HH}$  y el análisis DP4 para la asignación estereoquímica. En las Tablas 7, S1, S2 y S3 se presentan los resultados de los cálculos computacionales efectuados.

**Tabla 7.** Resultados del análisis de probabilidad DP4+ con diferentes niveles de teoría y con el análisis J-DP4

Configuración	DP4+		J-DP4
	mPW1PW91/ 6-31G+(d,p)	B3LYP/ 6-31G+(d,p)	B3LYP/ 6-31G+(d,p)
1'R,2'R	0.00 %	0.00 %	0.00 %
1'R,2'S	12.81 %	0.00 %	0.00 %
1'S,2'R	87.19 %	100.00 %	99.50 %
1'S,2'S	0.00 %	0.00 %	0.50 %

En resumen, el compuesto fue caracterizado como (Z)-2-metilbut-2-enoato de (S)-(5-acetil-2-hidroxifenil)((R)-3,3-dimetiloxiran-2-il)metil o 4-hidroxi-3-((S)-1'angeloiloxi-(R)-2',3'-epoxi-3'-metil)butil-acetofenona.



**Figura 11.** Estructura de **108** con su estereoquímica.

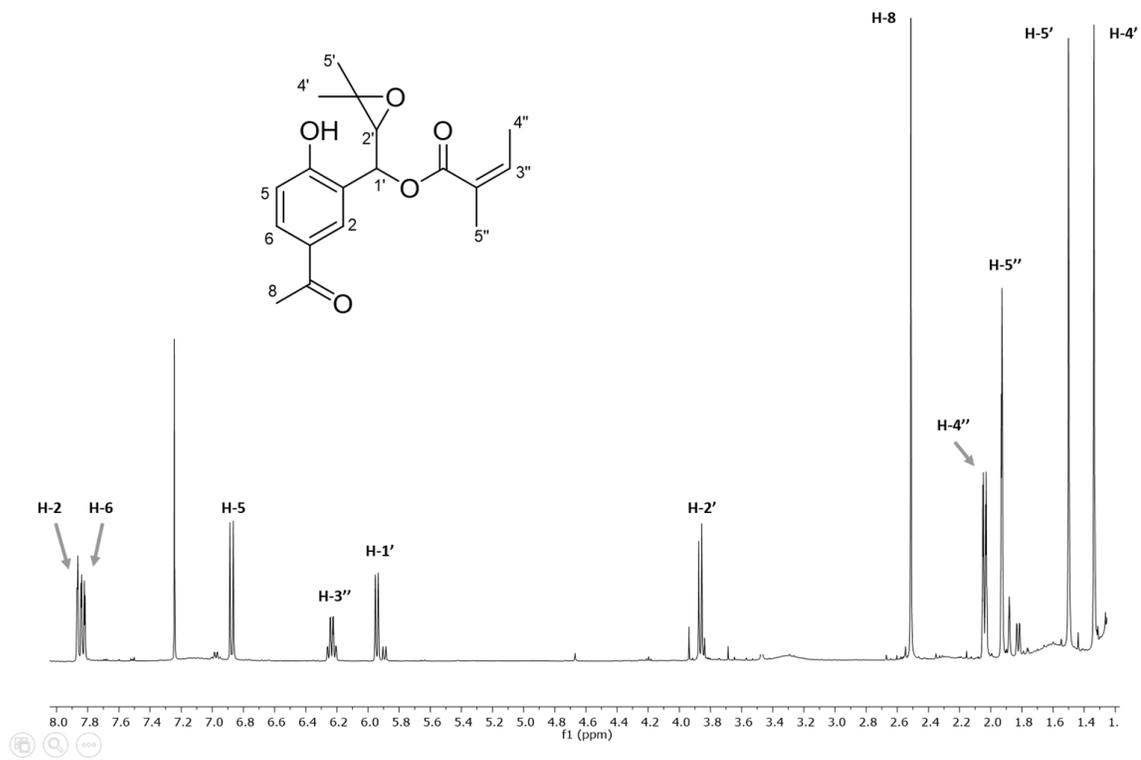


Figura 12. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de 108

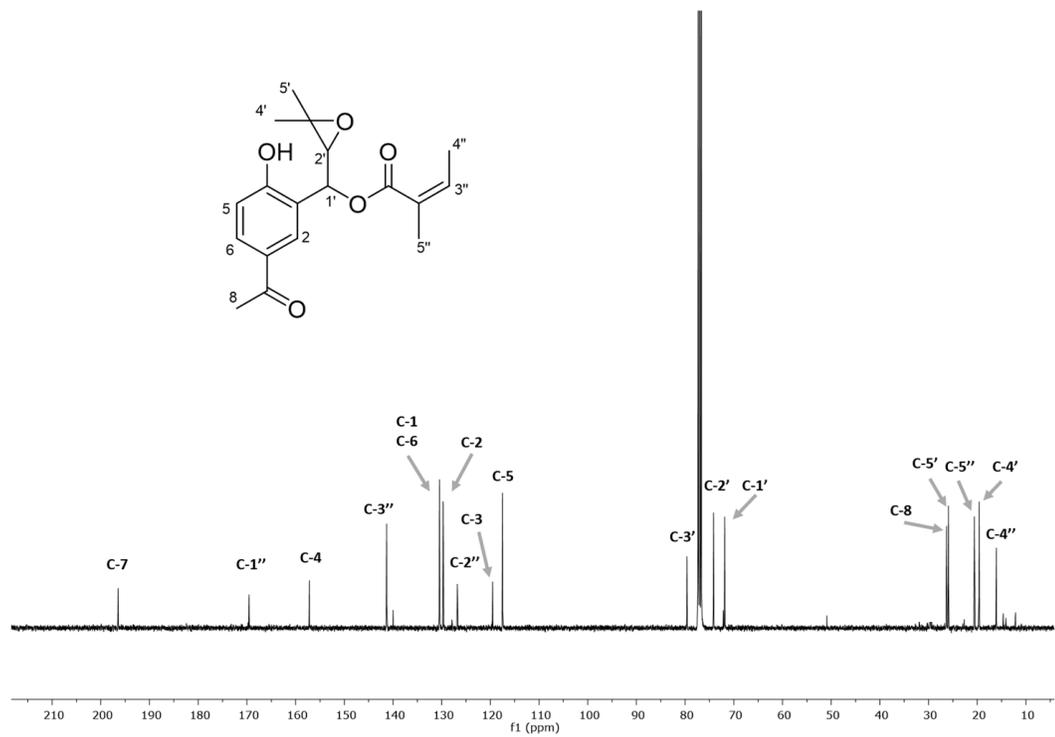


Figura 13. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de 108

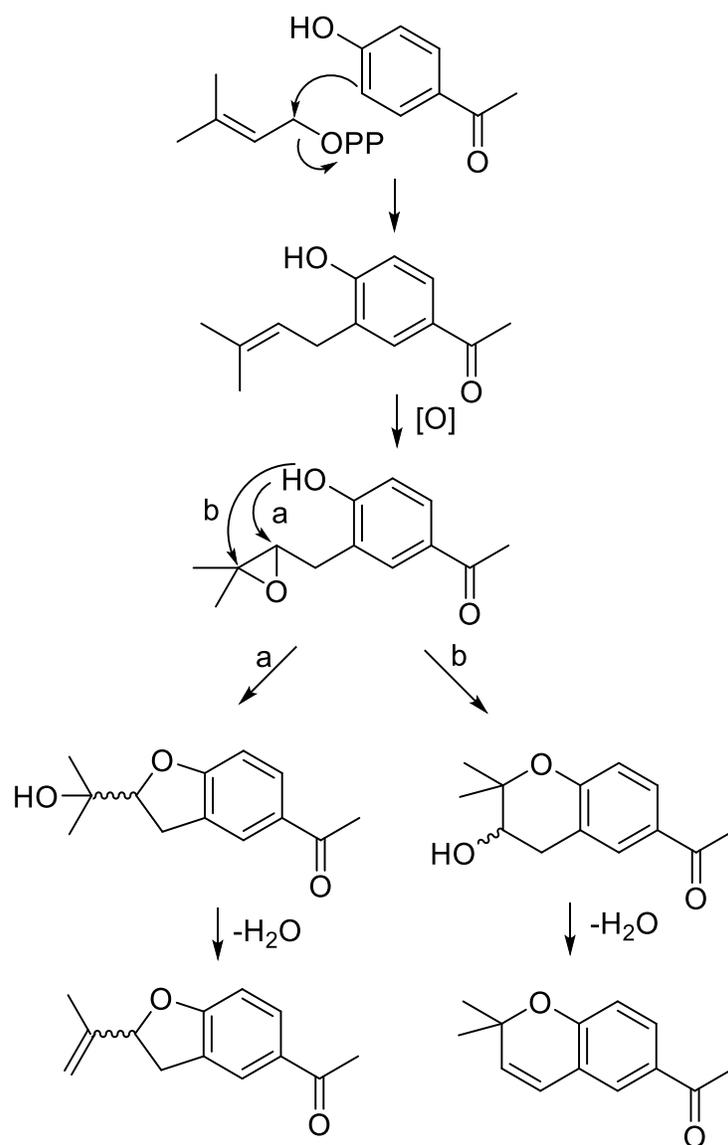
**Tabla 8.** Datos de RMN de **108** en CDCl<sub>3</sub>, (<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C, 100 MHz)

Posición	$\delta_c$	Tipo	$\delta_H$ , mult, (J en Hz)	COSY		HMBC	
				<sup>1</sup> H → <sup>1</sup> H	<sup>1</sup> H → <sup>13</sup> C		
1	130.4	C					
2	129.72	CH	7.87, d (1.7)			4, 6, 7, 1'	
3	119.5	C					
4	157.2	C					
5	117.5	CH	6.88, d (8.58)	6		3	
6	130.4	CH	7.83, dd (8.67, 2.1)	5		2, 4, 7	
7	196.4	C					
8	26.3	CH <sub>3</sub>	2.51, s			1	
1'	71.9	CH	5.94, d (7.57)	2''		1''	
2'	74.2	CH	3.87, d (7.56)	1'		3', 4', 5'	
3'	79.6	C					
4'	19.6	CH <sub>3</sub>	1.33, s			5'	
5'	25.9	CH <sub>3</sub>	1.50, s			4'	
1''	169.4	C					
2''	126.7	C					
3''	141.3	CH	6.2, qq (7.28, 1.49)	4'', 5''		3'	
4''	16.1	CH <sub>3</sub>	2.04, dq (7.27, 1.56)	3''		2'	
5''	20.6	CH <sub>3</sub>	1.93, p (1.55)	3''		1'	

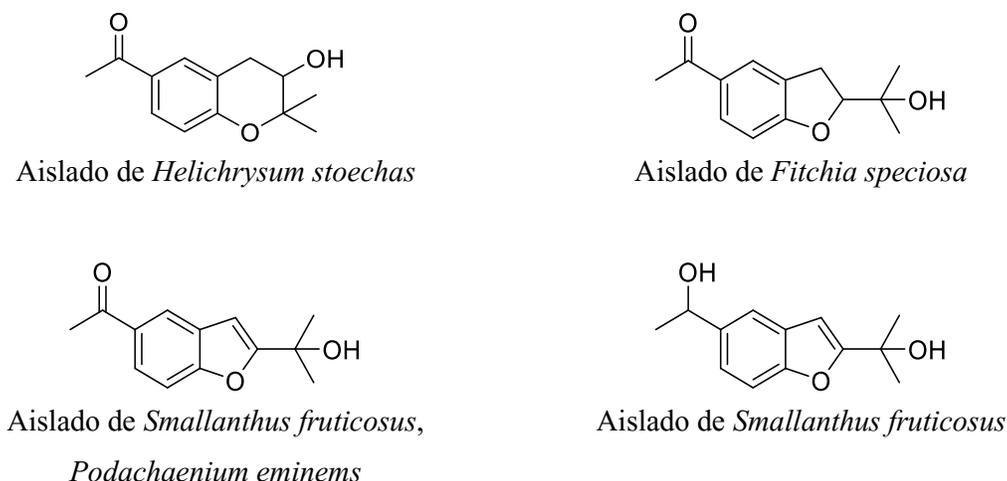
La hipótesis aceptada a la fecha respecto a la biogénesis de los cromenos y los benzofuranos encontrados en la familia Asteraceae, es que estos se forman por las rutas del ácido siquímico y DOXP (fosfato de desoxixilulosa). Los precursores primarios serían una unidad de L-fenilalanina y el difosfato de dimetil alilo. La L-fenilalanina tras una eliminación de amonio y pérdida de un carbono genera el fragmento C6C2. Posteriormente la prenilación del anillo aromático conlleva a la formación de una *p*-hidroxiacetofenona prenilada, que al sufrir una ciclación intramolecular vía un epóxido intermedio generaría el benzofurano o cromeno correspondiente (Proksch *et al.*, 1983; Siebertz *et al.*, 1989; 1990; Menut *et al.*, 2000) (**Figura 14**). Yamaguchi *et al.*, (2003) sugirieron que la ciclación puede ocurrir mediante una oxidación enzimática en las plantas, sin embargo, no se cuenta con evidencia de esta oxidación; ni enzimática ni la presencia de un epóxido intermediario, el cual es inestable, y fácilmente experimenta un ataque nucleofílico por parte del fenol para producir los derivados benzofurano o cromano (Gil *et al.*, 2017). Otras de las reacciones antes mencionada cuenta con suficiente evidencia experimental (Lopes *et al.*, 2006, Leite *et al.*, 2007) (**Figura 15**).

Entonces, el epóxido **108** obtenido en este estudio podría ser el epóxido intermediario que genera a los benzofuranos o cromanos. Este producto representa la primera *p*-hidroxiacetofenona prenilada, que contiene un grupo epóxido susceptible a sufrir un ataque nucleofílico espontáneo

del fenol en la posición orto (Gil *et al.*, 2017). Estos epóxidos son muy inestables, de allí que no se hayan aislado anteriormente. Se podría especular que el residuo de ácido angélico le confiere alguna estabilidad, por lo que es una pregunta que habría que responder en un futuro.



**Figura 14.** Formación del heterociclo para los cromenos y benzofuranos a partir de *p*-hidroxiacetofenona (Imagen modificada de Castañeda, 1998).



**Figura 15.** Metabolitos intermediarios en la formación de cromenos y benzofuranos en Asteraceae (Proksch, 1983).

#### 6.4 Composición química del aceite esencial

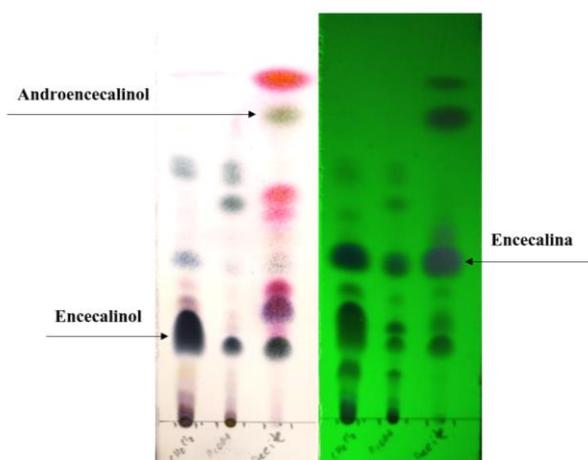
El estudio de la composición de los aceites esenciales es de gran relevancia, ya que además de ser empleado frecuentemente como una prueba de identidad, los aceites esenciales constituyen una valiosa, y en gran medida inexplorada fuente de posibles fármacos; sus componentes ofrecen propiedades únicas gracias a sus características fisicoquímicas y muchos de ellos cumplen con los requerimientos necesarios desde el punto de vista de la química farmacéutica para ser candidatos a fármacos (Feyaerts *et al.*, 2020).

La identificación de los componentes del aceite esencial obtenido por hidrodestilación de *A. grandifolia* se realizó mediante CG-EM. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 9 y en la Figura 16. El rendimiento del aceite fue de aproximadamente 0.7 % con base al peso de la planta seca. Los compuestos se identificaron mediante la comparación de sus datos espectrales de masas con la biblioteca de espectros de masas del National Institute of Standards and Technology (NIST 98) y de los índices de retención, calculados con respecto a una serie homóloga de *n*-alcanos (Van Del Dool y Kratz, 1963) con los descritos por Adams (2007). Algunos de los componentes fueron comparados con muestras auténticas.

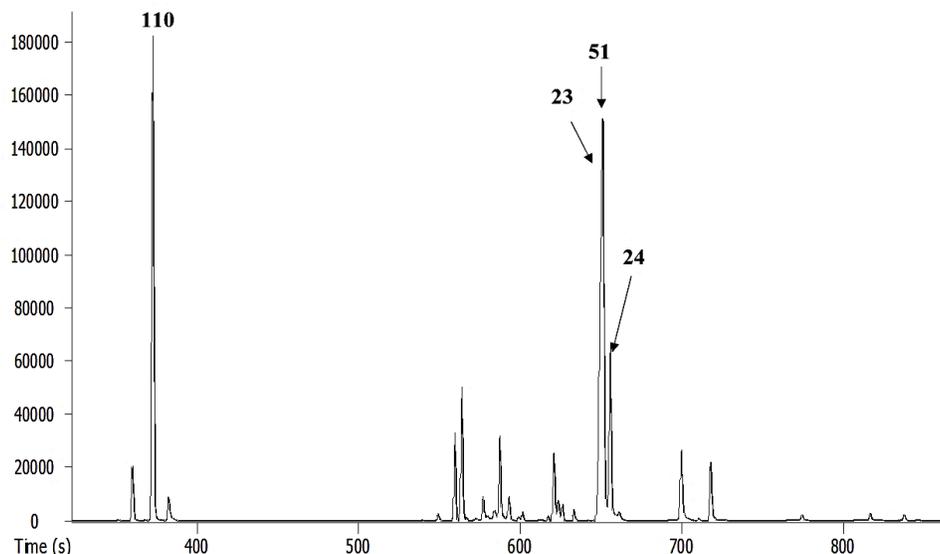
Este análisis permitió la identificación de 16 constituyentes del aceite esencial, que representan un 91.56 % de la composición (**Tabla 9**). El aceite está compuesto principalmente por

sesquiterpenoides y cromenos, con desmetoxiencicalina (**23**), encocalinol (**24**),  $\beta$ -eudesmol (**51**) y *o*-cimeno (**110**) como productos mayoritarios. Estos representan el 54.6% del contenido total.

Aunque no existen estudios sobre la composición del aceite de *A. grandifolia*, las esencias de otras especies del género contienen terpenoides y cromenos. Así el aceite de *A. pichinchensis* contiene los cromenos **23**, **24** y **26**, y el de *A. adenophora* contiene a **32** (Torres Barajas *et al.*, 2013; Weyerstahl *et al.*, 1997). Estos cromenos son de fácil detección por cromatografía en capa delgada y sus características hacen que estos compuestos sean de utilidad como compuestos marcadores a la hora de generar las pruebas de calidad de las plantas que los contienen.



**Figura 16.** Cromatografía en capa fina de izquierda a derecha de los repartos de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt y aceite esencial de *A. grandifolia*. A) Revelado con anisaldehído. B) UV a 254 nm. Sistema de elución hexano/tolueno/AcOEt (5:4:1)



**Figura 17.** Cromatograma iónico total del aceite esencial de *A. grandifolia* analizado por CG-EM.

**Tabla 9** Compuestos volátiles identificados por CG-EM a partir del aceite esencial de *A. grandifolia*

No.	Compuesto	IR		Área (%)	Método de identificación
		IR teórico	experimental		
1	$\alpha$ -Felandreno	1002	989.78	1.9866	EM, IR
2	o-Cimeno	1022	1010.2	8.301	EM, IR
3	Fenilacetaldehído	1039	1028.7	2.5723	EM, IR
4	$\beta$ -Buurboneno	1387	1378	1.9877	EM, IR
5	$\alpha$ -Gurjuneno	1409	1402.3	2.237	EM, IR
6	Cariofileno	1417	1413.9	2.2566	EM, IR
7	$\alpha$ -Humuleno	1452	1449	4.4336	EM, IR
8	Germacreno D	1484	1476.2	4.7327	EM, IR
9	Biciclogermacreno	1500	1491.1	1.3924	EM, IR
10	Palustrol	1567	1565	6.2218	EM, IR
11	$\beta$ -Vatireno	1574	1572.1	2.7873	EM, IR
12	NI	-	1597.8	0.7388	-
13	Desmetoxiencalinalina	1646	1651.1	18.306	EM, IR, STD
14	$\beta$ -Eudesmol	1649	1645.2	19.052	EM, IR
15	Androencecalinol	1675	1664.9	4.0431	EM, IR, STD
16	Encecalinol	-	1796.9	8.9769	EM, STD
17	Encecalina	1866	1855.9	2.2726	EM, IR, STD
18	NI	-	2044.5	2.4872	-
19	NI	-	2195.8	3.2129	-
20	NI	-	2277.2	2.008	-

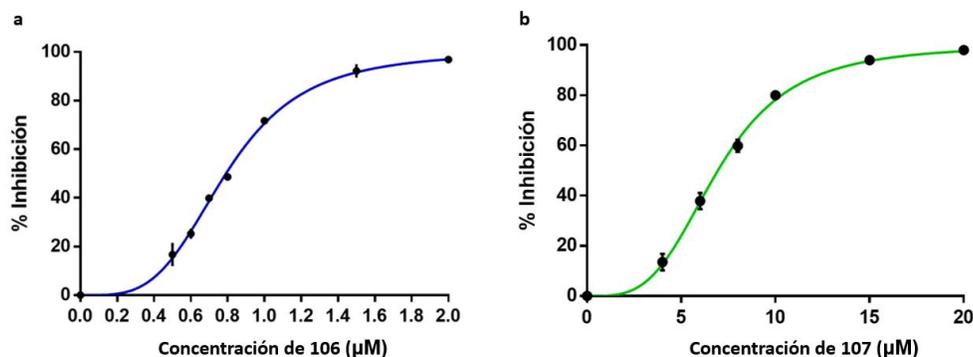
## 6.5 Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*

Para la evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* del aceite esencial, las fracciones de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt y los compuestos **23-25**, **32**, **105-108** se empleó un ensayo de tipo espectrofotométrico, basado en la cuantificación de *p*-nitrofenol generado por la hidrólisis enzimática del *p*-nitrofenol- $\alpha$ -D-glucopiránosido (*p*-NPG). La acarbosa fue utilizada como control positivo. A continuación, se presentan los resultados de las evaluaciones en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Resultados obtenidos de la evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae*

Compuesto	CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	Extracto	CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>23</b>	460 $\pm$ 2	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	362.8 $\pm$ 7.74
<b>24</b>	400 $\pm$ 2	<b>AcOEt</b>	75.42 $\pm$ 12.83
<b>25</b>	400 $\pm$ 2	<b>Aceite</b>	137.5 $\pm$ 0.88
<b>32</b>	440 $\pm$ 2.6		
<b>105</b>	400 $\pm$ 3		
<b>106</b>	0.79 $\pm$ 0.006		
<b>107</b>	6.957 $\pm$ 0.063		
<b>108</b>	290 $\pm$ 4		
<b>Acarbosa</b>	300 $\pm$ 4		

Todos los compuestos presentaron actividad significativa como inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa, con CI<sub>50</sub> comparables a las de la acarbosa, a excepción de **106** y **107**, cuyos valores de CI<sub>50</sub> son menores a los de la acarbosa; la comparación de los valores de CI<sub>50</sub> de **105** y **106**, parece sugerir que el residuo de ácido cafeico ayuda a incrementar la actividad inhibitoria de estos compuestos; por otro lado la diferencia entre **106** y **107** es la presencia de un fenol extra en **106**, en la posición 4', lo que aumenta la actividad inhibitoria; esto coincide con datos reportados en la literatura sobre el impacto de la hidroxilación en el anillo B de los flavonoides sobre la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas (Xu, 2010).



**Figura 18.** Curva concentración-respuesta de a) **106** y b) **107** sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae*.

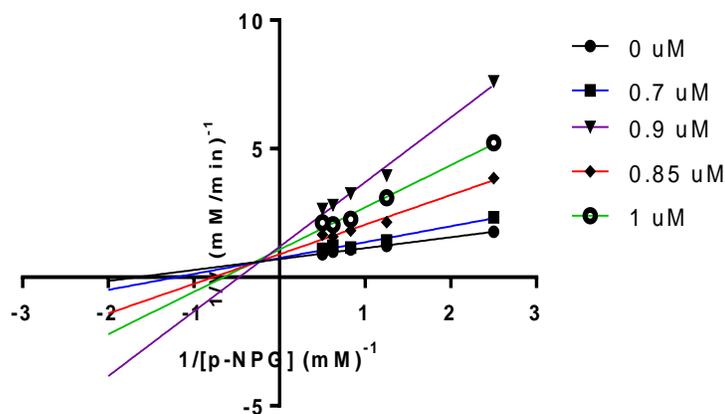
Es importante mencionar que todos estos compuestos no habían sido evaluados previamente como inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa. Sin embargo, no debe perderse de vista la necesidad de realizar estos ensayos con enzimas de mamíferos, ya que éstas últimas y las  $\alpha$ -glucosidasas de la levadura pertenecen a familias con diferencias en sus secuencias de aminoácidos, y por lo tanto en su habilidad para actuar sobre diferentes sustratos, por lo que sería importante complementar estos estudios para comprobar la actividad inhibitoria de los metabolitos aislados (Krasikov *et al.*, 2001). También debe notarse que existen estudios *in vivo* que comprueban el efecto de algunos flavonoides y cromenos sobre las alfa-glucosidasas (Fontana Pereira *et al.*, 2011; Escandón-Rivera, *et al.*, 2017).

También es importante recordar que la inhibición producida por las enzimas de *S. cerevisiae* podría relacionarse con un rol ecológico, para defender a la planta contra los ataques de insectos u hongos, por lo que no debe descartarse la utilidad del empleo de estos productos en el campo de la agricultura (Andrade-Cetto *et al.*, 2019). De hecho, algunos cromenos poseen actividad insecticida (Isman *et al.*, 1985.)

## 6.6 Cinética enzimática

Con el fin de caracterizar el tipo de interacción entre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* y **106**, el compuesto más activo, se realizó el ensayo de cinética enzimática generando curvas de saturación por sustrato a diferentes concentraciones de *p*-NPG y del inhibidor **106**. El gráfico de Lineweaver-Burk del compuesto **106** (Figura 19) muestra una intersección de las distintas rectas en el cuadrante (x, -y), lo que indica una inhibición reversible de tipo mixta ( $R^2=0.8505$ ), esto significa que el inhibidor es capaz de unirse tanto a la enzima, como al complejo formado con el

sustrato (Baño *et al.*, 2007); este tipo de inhibición coincide con lo reportado en la literatura, ya que la mayoría de los flavonoides presentan este comportamiento (Xu, 2010; Proença *et al.*, 2017).



**Figura 19.** Gráfico de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk de la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones de **106**.

## 6.7 Estudios de acoplamiento molecular

Para complementar la actividad biológica observada *in vitro* se realizaron estudios de acoplamiento molecular (docking) entre los compuestos más activos (**106** y **107**) y la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* (código PDB: 3A4A).

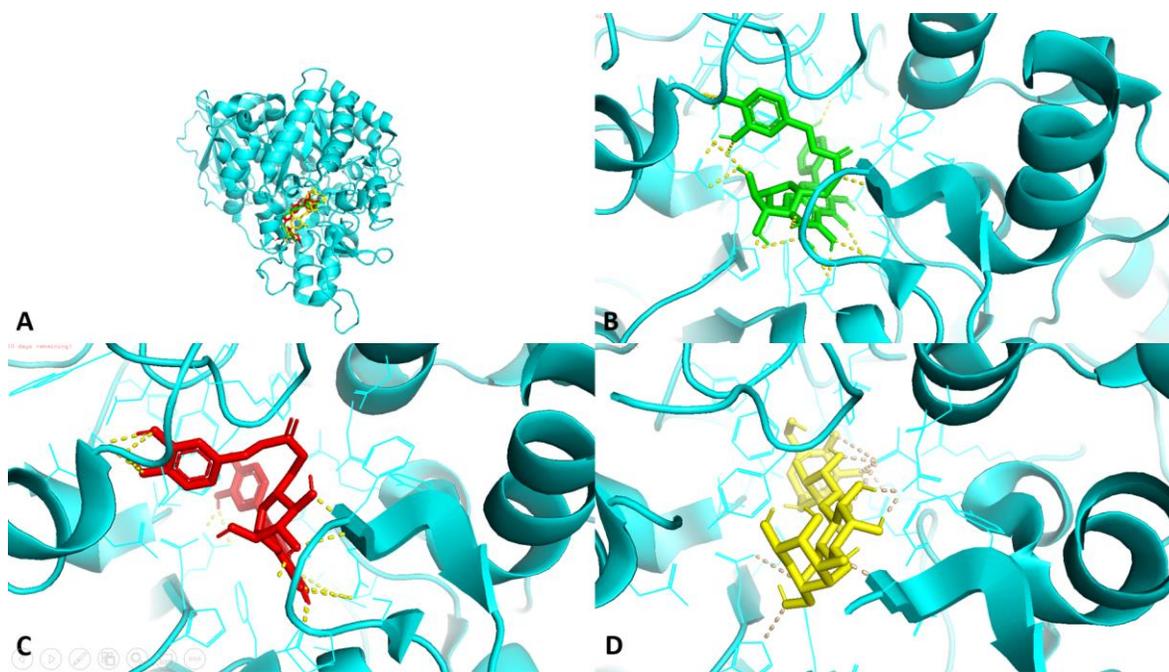
Los estudios de acoplamiento molecular son métodos de simulación para predecir la estructura de un complejo ligando-receptor, en el cual, el receptor es una proteína y el ligando es una molécula pequeña. La meta de las simulaciones de este tipo es ajustar la pose del ligando en la proteína, análogamente al modelo de la llave y la cerradura de la especificidad de las enzimas. Desde el punto de vista computacional, el acoplamiento molecular es un problema de optimización, donde el objetivo es encontrar la posición correcta del ligando entre un conjunto de posibles posiciones (de Azevedo, 2019).

La enzima estudiada está compuesta por tres dominios, llamados A, B y C. El dominio A (residuos 1-113 y 190-512) es un dominio catalítico que contiene un barril  $(\beta/\alpha)_8$ , el dominio B (residuos 114-189) se encuentra insertado entre la tercera lámina  $\beta$  y la hélice del barril  $(\beta/\alpha)_8$  del dominio A. El dominio C (residuos 513-589) comprende ocho hebras  $\beta$  antiparalelas. El sitio catalítico se encuentra entre los dominios A y B, formando una estructura similar a una hendidura, e incluye a los siguientes residuos: Asp69, His112, Arg213, Asp215, Glu277, His351, Asp352, Arg442. Otros

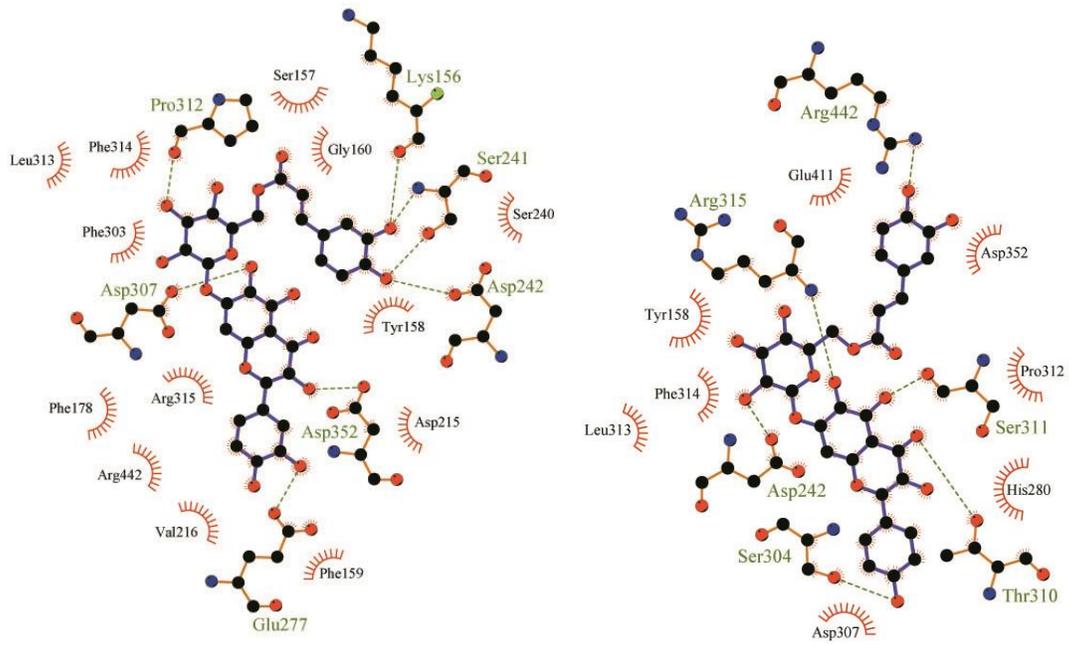
residuos de importancia son Tyr158, His280 y el asa 210-315, los cuales se encuentran a la entrada del sitio catalítico y ayudan en el reconocimiento de los sustratos (Yamamoto *et al.*, 2010).

En estos estudios se observó que los compuestos **106** y **107** interaccionan en el sitio catalítico (Figura 20). Adicionalmente, para validar, se modeló el modo de unión del control positivo, la acarbosa, que también se une en el sitio catalítico.

Con las representaciones en 2D, obtenidas con LigPlot+ (Figura 21), se observa que el compuesto **106** presenta interacciones por puentes de hidrógeno con los residuos Lys156, Ser241, Asp242, Glu277, Asp307, Pro312 y Asp352. Para el compuesto **107** se observan las interacciones con los residuos Asp242, Ser304, Thr310, Ser311, Arg315 y Arg442 (Figura 21). Es destacable que las interacciones varían considerablemente por la presencia del fenol adicional en **106**, lo que podría estar en concordancia con lo mencionado anteriormente, sobre el efecto de los sustituyentes hidroxilo sobre los anillos B de flavonoides.



**Figura 20.** A. Modelo estructural de los complejos formados entre la  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* con **106** (verde), **107** (rojo) y acarbosa (amarillo). Representación 3D de los sitios de unión entre B. **106** C. **107** y D. Acarbosa



**Figura 21.** Aminoácidos involucrados en la unión de (A) **106** y (B) **107** con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae*

## 7. CONCLUSIONES

La especie *Ageratina grandifolia* representa una fuente valiosa de inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas. Todos los compuestos aislados mostraron actividad inhibitoria equiparable a la acarbosa, a excepción de **106** y **107**, con una actividad mucho mayor.

A partir de la infusión de las partes aéreas y el aceite esencial de *A. grandifolia* fue posible el aislamiento de cinco cromenos, tres flavonoides y una *p*-hidroxiacetofenona nueva, lo cual concuerda con otros estudios de la química del género.

El epóxido **108** obtenido en este estudio podría ser el epóxido intermediario que genera a los benzofuranos o cromanos. Este producto representa la primera *p*-hidroxiacetofenona prenilada, que contiene un grupo epóxido susceptible a sufrir un ataque nucleofílico intramolecular del fenol en la posición *orto*. Se podría especular que el residuo de ácido angélico le confiere alguna estabilidad al epóxido **108**, sin embargo, las razones de esta estabilidad quedan como preguntas que habría que responder en un futuro.

El análisis del aceite esencial permitió determinar cómo productos mayoritarios a los metabolitos desmetoxiencecalina (**23**), encecalinol (**24**),  $\beta$ -eudesmol (**51**) y *o*-cimeno (**110**). Los cromenos presentes en el aceite, pueden fungir como compuestos marcadores para generar las pruebas de calidad.

## 8. PERSPECTIVAS

Evaluar los flavonoides **106** y **107** en pruebas *in vivo* para corroborar su actividad como inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas.

Establecer el perfil cromatográfico del extracto acuoso, con la finalidad de contribuir al desarrollo de pruebas de calidad para la planta

Investigar el extracto orgánico total en búsqueda de otros metabolitos que puedan fungir como inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas.

Investigar las razones de la estabilidad del epóxido en **108** y el papel que podría desempeñar el residuo de ácido angélico en este fenómeno.

Realizar un estudio etnobotánico de *A. grandifolia* en la comunidad de Capulálpam de Méndez, Oaxaca

## 9. REFERENCIAS

Academia Nacional de Medicina de México (1 de septiembre de 1887). Apuntes acerca de plantas indígenas de la familia de las compuestas empleadas en la medicina. *Gaceta Médica de México*. 23(17) pp.351-359.

Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (Vol. 456). Carol Stream, IL: Allured publishing corporation.

Aguilar-Guadarrama, B., Navarro, V., Leon-Rivera, I., y Rios, M. Y. (2009). Active compounds against tinea pedis dermatophytes from *Ageratina pichinchensis* var. *bustamenta*. *Natural Product Research*, 23(16), 1559-1565.

Alonso-Castro, A. J., Domínguez, F., Maldonado-Miranda, J. J., Castillo-Pérez, L. J., Carranza-Álvarez, C., Solano, E., y Ruiz-Padilla, A. J. (2017). Use of medicinal plants by health professionals in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 81-86.

American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37 (Supplement 1), S81-S90.

Andrade-Cetto, A., Cruz, E. C., Cabello-Hernández, C. A., y Cárdenas-Vázquez, R. (2019). Hypoglycemic activity of medicinal plants used among the Cakchiquels in Guatemala for the treatment of type 2 diabetes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.

Andrade-Cetto, A., y Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 325-348.

Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A. L., Meléndez-Aguirre, M., Ávila, J. G., García-Bores, A. M., Villaseñor, J. L., y Romo de Vivar, A. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of *Ageratina deltoidea*. *Chemistry & Biodiversity*, 15(3), e1700529.

Arredondo, A., y Reyes, G. (2013). Health disparities from economic burden of diabetes in middle-income countries: evidence from México. *PLOS One*, 8(7) e68443.

Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana (2015). [Consultado el 21 de abril de 2020]. Recuperado de:  
<https://ca.unadmexico.mx/contenidos/DCSA/BLOQUE1/GT/05/QCSL/MA/E3/E3.%20Atlas%20de%20las%20Plantas%20de%20la%20Medicina%20tradicional%20Mexicana.pdf>

Bañó, C., Pamblanco, M., Peretó, J., y Sendra, R. (2007). *Fundamentos de bioquímica* (Vol. 96). Universitat de València.

Barquera, S., Campos-Nonato, I., Aguilar-Salinas, C., Lopez-Ridaura, R., Arredondo, A., y Rivera-Dommarco, J. (2013). Diabetes in Mexico: cost and management of diabetes and its complications and challenges for health policy. *Globalization and health*, 9(1), 3.

Barrio, G. D., Spengler, I., García, T., Roque, A., Álvarez, Á. L., Calderón, J. S., y Parra, F. (2011). Antiviral activity of *Ageratina havanensis* and major chemical compounds from the most active fraction. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(5), 915-920.

Bermejo, S., Pascual, J., y Soler, M. J. (2017). Nuevas oportunidades en el tratamiento antidiabético oral en el paciente con enfermedad renal crónica. *Nefrología*, 9(2), 14-27.

Bohlmann, F., Banerjee, S., Wolfrum, C., Jakupovic, J., King, R. M., y Robinson, H. (1985). Sesquiterpene lactones, geranylnerol and tremetone derivatives from *Ageratina* species. *Phytochemistry*, 24(6), 1319-1321.

Borges de Melo, E. B., da Silveira Gomes, A., y Carvalho, I. (2006).  $\alpha$ -and  $\beta$ -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*, 62(44), 10277-10302.

Bustos-Brito, C., Andrade-Cetto, A., Giraldo-Aguirre, J. D., Moreno-Vargas, A. D., y Quijano, L. (2016). Acute hypoglycemic effect and phytochemical composition of *Ageratina petiolaris*. *Journal of Ethnopharmacology*, 185, 341-346.

Bustos-Brito, C., Sánchez-Castellanos, M., Esquivel, B., Calderón, J. S., Calzada, F., Yepez-Mulia, L., y Quijano, L. (2014). Structure, absolute configuration, and antidiarrheal activity of a thymol derivative from *Ageratina cylindrica*. *Journal of Natural Products*, 77(2), 358-363.

Bustos-Brito, C., Sánchez-Castellanos, M., Esquivel, B., Calderón, J. S., Calzada, F., Yepez-Mulia, L., y Quijano, L. (2015). *ent*-Kaurene Glycosides from *Ageratina cylindrica*. *Journal of Natural Products*, 78(11), 2580-2587.

Campuzano-Maya, G., y Latorre-Sierra, G. (2010). La HbA1c en el diagnóstico y en el manejo de la diabetes. *Medicina & Laboratorio*, 16(05-06), 211-241.

Carrillo-Hormaza, L., Mora, C., Alvarez, R., Alzate, F., y Osorio, E. (2015). Chemical composition and antibacterial activity against *Enterobacter cloacae* of essential oils from Asteraceae species growing in the Páramos of Colombia. *Industrial Crops and Products*, 77, 108-115.

Castañeda-Pérez (1993). Potencialidad herbicida de los cromenos y benzofuranos mayoritarios aislados de *Helianthella quinquenervis* (Hook) A. Gray (Asteraceae). Universidad Nacional Autónoma de México.

Chiba, S., y Shimomura, T. (1978). Diversity of substrate specificity of  $\alpha$ -glucosidase. *Journal of the Japanese Society of Starch Science*, 25(2), 105-112.

Davies, G., y Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853-859.

de Azevedo Jr, W. F. (2019). *Docking Screens for Drug Discovery*. Humana Press.

Escandón-Rivera, S. M., Mata, R., y Andrade-Cetto, A. (2020). Molecules isolated from Mexican hypoglycemic plants: A Review. *Molecules*, 25(18), 4145.

Escandón-Rivera, S., Pérez-Vásquez, A., Navarrete, A., Hernández, M., Linares, E., Bye, R., & Mata, R. (2017). Anti-hyperglycemic activity of major compounds from *Calea ternifolia*. *Molecules*, 22(2), 289.

Fang, N. B., Yu, S. G., y Mabry, T. J. (1988). Chromenes from *Ageratina arsenei* and revised structures of two epimeric chromene dimers. *Phytochemistry*. 27(6), 1902-1905.

Fang, N., y Mabry, T. J. (1986). Flavonoid aglycones from *Ageratina tomentella*. *Journal of Natural Products*, 49(4), 738-739.

Fang, N., Yu, S., y Mabry, T. J. (1986). Flavonoids from *Ageratina calophylla*. *Phytochemistry*, 25(11), 2684-2686.

Federación Internacional de la Diabetes. (2019). Atlas de la Diabetes de la FID. 9ª edición. Versión online del Atlas de la Diabetes de la FID2019. [Consultado el 20 de abril de 2020]. Recuperado de: <https://www.diabetesatlas.org/es/>

Feyaerts, A. F., Luyten, W., y Van Dijck, P. (2020). Striking essential oil: tapping into a largely unexplored source for drug discovery. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11.

Fontana-Pereira, D. F., Cazarolli, L. H., Lavado, C., Mengatto, V., Figueiredo, M. S. R. B., Guedes, A., y Silva, F. R. M. B. (2011). Effects of flavonoids on  $\alpha$ -glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition*, 27(11-12), 1161-1167.

García-Hernández, K. Y., Vibrans, H., Rivas-Guevara, M., y Aguilar-Contreras, A. (2015). This plant treats that illness? The hot–cold system and therapeutic procedures mediate medicinal plant use in San Miguel Tulancingo, Oaxaca, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 163, 12-30.

García-Sánchez, E., Ramírez-López, C. B., Talavera-Aleman, A., León-Hernández, A., Martínez-Muñoz, R. E., Martínez-Pacheco, M. M., y del Río, R. E. (2014). Absolute configuration of (13 R)-and (13 S)-labdane diterpenes coexisting in *Ageratina jocotepecana*. *Journal of Natural Products*, 77(4), 1005-1012

Gil, D. M., Lizárraga, E., Echeverría, G. A., Piro, O. E., Catalán, C. A. N., y Altabef, A. B. (2017). A combined experimental and theoretical study of the supramolecular self-assembly of the natural benzopyran 2, 2-dimethyl-3-hydroxy-6-acetyl-chromane and its isomeric benzofuran 10, 11-dihydro-10-hydroxytremetone. *Journal of Molecular Structure*, 1146, 164-178.

González, A. G., Barrera, J. B., Yanes, A. C., Díaz, J. G., y Pérez, E. M. R. (1989). Chromenes and benzofurans from *Ageratina glechonophylla*. *Phytochemistry*, 28(9), 2520-2522.

Grimblat, N., Gavín, J. A., Hernández Daranas, A., y Sarotti, A. M. (2019). Combining the Power of *J* Coupling and DP4 Analysis on Stereochemical Assignments: The *J*-DP4 Methods. *Organic Letters*, 21(11), 4003-4007.

Grimblat, N., Zanardi, M. M., & Sarotti, A. M. (2015). Beyond DP4: an improved probability for the stereochemical assignment of isomeric compounds using quantum chemical calculations of NMR shifts. *The Journal of Organic Chemistry*, 80(24), 12526-12534.

He, L., Hou, J., Gan, M., Shi, J., Chantrapromma, S., Fun, H. K., y Sung, H. H. Y. (2008). Cadinane sesquiterpenes from the leaves of *Eupatorium adenophorum*. *Journal of Natural Products*, 71(8), 1485-1488.

Hernández F. (1615). Historia de las plantas de la Nueva España. Tomo 1. Libro primero. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 1943.

Herz, W., y Gibaja, S. (1972). 5-Hydroxy-6, 7, 4'-trimethoxyflavone from *Ageratina gilbertii*. *Phytochemistry*. 11, 2625.

Hinojosa-Espinosa, O., Villaseñor, J. L., y Ortiz, E. (2019). On the identity of two Mexican species of *Ageratina* (Eupatorieae, Asteraceae): *A. grandifolia* and *A. rivalis*. *Botanical Sciences*, 96(2), 250-219.

Instituto Nacional de Antropología e Historia (2020). Lugares INAH - Axihuitl. [Consultado el 17 de agosto de 2020]. Recuperado de: [https://lugares.inah.gob.mx/es/museos-inah/museo/museo-piezas/12915-12915-axihuitl.html?lugar\\_id=389](https://lugares.inah.gob.mx/es/museos-inah/museo/museo-piezas/12915-12915-axihuitl.html?lugar_id=389)

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2017). Características de las defunciones registradas en México durante 2017. [Consultado el 20 de abril de 2020]. Recuperado de: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONE S2017.pdf>

Instituto Nacional de Salud Pública (2018) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición-2018 [Consultado el 19 de abril de 2020]. Recuperado de: [https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut\\_2018\\_presentacion\\_resultados.pdf](https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf)

Isman, M. B., & Proksch, P. (1985). Deterrent and insecticidal chromenes and benzofurans from *Encelia* (Asteraceae). *Phytochemistry*, 24(9), 1949-1951.

Israili, Z. H. (2011). Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Therapeutics*, 18(2), 117-152.

Joseph-Nathan, P., Wesener, J. R., y Günther, H. (1984). A two-dimensional NMR study of angelic and tiglic acid. *Organic Magnetic Resonance*, 22(3), 190-191.

Kerru, N., Singh-Pillay, A., Awolade, P., y Singh, P. (2018). Current anti-diabetic agents and their molecular targets: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 152, 436-488.

Kharroubi, A. T., y Darwish, H. M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*, 6(6), 850.

King, R. M., y Robinson, H. (1970). Studies in the Eupatorieae (Compositae). XIX. new combinations in *Ageratina*. *Phytologia*.

Krasikov, V. V., Karelov, D. V., y Firsov, L. M. (2001).  $\alpha$ -Glucosidases. *Biochemistry (Moscow)*, 66(3), 267-281.

Krentz, A. J., y Bailey, C. J. (2005). Oral antidiabetic agents. *Drugs*, 65(3), 385-411.

Kurade, N. P., Jaitak, V., Kaul, V. K., y Sharma, O. P. (2010). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Lantana camara*, *Ageratum houstonianum* and *Eupatorium adenophorum*. *Pharmaceutical Biology*, 48(5), 539-544.

- Lee, S. T., Davis, T. Z., Gardner, D. R., Colegate, S. M., Cook, D., Green, B. T., y Evans, T. J. (2010). Tremetone and structurally related compounds in white snakeroot (*Ageratina altissima*): a plant associated with trembles and milk sickness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8560-8565.
- Lee, S. T., Davis, T. Z., Gardner, D. R., Stegelmeier, B. L., y Evans, T. J. (2009). Quantitative method for the measurement of three benzofuran ketones in rayless goldenrod (*Isocoma pluriflora*) and white snakeroot (*Ageratina altissima*) by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5639-5643.
- Leite, A. C., Lopes, A. A., Kato, M. J., Bolzani, V. D. S., y Furlan, M. (2007). Biosynthetic origin of the isoprene units in chromenes of *Piper aduncum* (Piperaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(8), 1500-1503.
- Lima, T. C., Santos, A. D. C., Costa, D., Souza, R. J., Barison, A., Steindel, M., y Biavatti, M. W. (2015). Chromenes from leaves of *Calea pinnatifida* and evaluation of their leishmanicidal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(1), 7-10.
- Lin, A. H. M., Lee, B. H., & Chang, W. J. (2016). Small intestine mucosal  $\alpha$ -glucosidase: A missing feature of in vitro starch digestibility. *Food Hydrocolloids*, 53, 163-171.
- Lopes, A. A., Baldoqui, D. C., López, S. N., Kato, M. J., Bolzani, V. D. S., y Furlan, M. (2007). Biosynthetic origins of the isoprene units of gaudichaudianic acid in *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). *Phytochemistry*, 68(15), 2053-2058.
- Marcarino, M. O., Zanardi, M. M., Cicetti, S., y Sarotti, A. M. (2020). NMR calculations with quantum methods: development of new tools for structural elucidation and beyond. *Accounts of Chemical Research*, 53(9), 1922-1932.
- Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., y Rivero-Cruz, I. (2013). Mexican antidiabetic herbs: valuable sources of inhibitors of  $\alpha$ -glucosidases. *Journal of Natural Products*, 76(3), 468-483.
- Mata, R., Figueroa, M., Navarrete, A., y Rivero-Cruz, I. (2019). Chemistry and Biology of Selected Mexican Medicinal Plants. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 108* (pp. 1-142). Springer, Cham.
- Meckes, M., Villarreal, M. L., Tortoriello, J., Berlin, B., y Berlin, E. A. (1995). A microbiological evaluation of medicinal plants used by the Maya people of Southern Mexico. *Phytotherapy Research*, 9(4), 244-250.

- Menut, C., Bessiere, J. M., Ntalani, H., Verin, P., Henriques, A. T., y Limberger, R. (2000). Two chromene derivatives from *Calyptanthus tricona*. *Phytochemistry*, 53(8), 975-979.
- Nair, A. R., Jayaprakasam, R., Gunasekaran, R., Bayet, C., y Voirin, B. (1993). 6-hydroxykaempferol 7-(6''-caffeoylglucoside) from *Eupatorium glandulosum*. *Phytochemistry*, 33(5), 1275-1276.
- Oelrichs, P. B., Calanatan, C. A., Macleod, J. K., Seawright, A. A., y Ng, J. C. (1995). Isolation of a compound from *Eupatorium adenophorum* (Spreng.) [*Ageratina adenophora* (Spreng.)] causing hepatotoxicity in mice. *Natural Toxins*, 3(5), 350-354.
- Olennikov, D. N., y Kashchenko, N. I. (2019). New flavonoids and turkesterone-2-O-cinnamate from leaves of *Rhaponticum uniflorum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 55(2), 256-264.
- Olennikov, D. N., Chirikova, N. K., y Kashchenko, N. I. (2015). Spinacetin, A New Caffeoylglucoside, and Other Phenolic Compounds from *Gnaphalium uliginosum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 51(60), 1085-1090.
- Organización Mundial de la Salud (2020). Qué es la diabetes. [Consultado el 19 de abril de 2020]. Recuperado de: [https://www.who.int/diabetes/action\\_online/basics/es/index1.html](https://www.who.int/diabetes/action_online/basics/es/index1.html)
- Osadebe, P. O., Odoh, E. U., y Uzor, P. F. (2014). Natural products as potential sources of antidiabetic drugs. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 2075-2095.
- Padalia, R. C., Bisht, D. S., Joshi, S. C., y Mathela, C. S. (2009). Chemical composition of the essential oil from *Eupatorium adenophorum* Spreng. *Journal of Essential Oil Research*, 21(6), 522-524.
- Pala-Paul, J., Perez-Alonso, M. J., Velasco-Negueruela, A., y Sanz, J. (2002). Analysis by gas chromatography–mass spectrometry of the volatile components of *Ageratina adenophora* Spreng., growing in the Canary Islands. *Journal of Chromatography A*, 947(2), 327-331.
- Pardo-Novoa, J. C., Arreaga-González, H. M., Gómez-Hurtado, M. A., Rodríguez-García, G., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan, P., y del Río, R. E. (2016). Absolute configuration of menthene derivatives by vibrational circular dichroism. *Journal of Natural Products*, 79(10), 2570-2579.
- Parejo, I., Bastida, J., Viladomat, F., y Codina, C. (2005). Acylated quercetagenin glycosides with antioxidant activity from *Tagetes maxima*. *Phytochemistry*, 66(19), 2356-2362.
- Payró A. (1883) Estudio sobre la yerba del ángel. Facultad de Medicina de México.

Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Oliveira, E. F., Sousa, J. L., Tomé, S. M., y Fernandes, E. (2017).  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by flavonoids: an *in vitro* and *in silico* structure–activity relationship study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 1216-1228.

Proksch, P., y Rodriguez, E. (1983). Chromenes and benzofurans of the Asteraceae, their chemistry and biological significance. *Phytochemistry*, 22(11), 2335-2348.

Ramawat, K. G. (2019). *Biodiversity and Chemotaxonomy*. Springer.

Ramírez-López, C. B., García-Sánchez, E., Martínez-Muñoz, R. E. M. M., Del Río, R. E., y Martínez-Pacheco, M. M. (2016). Chemical composition of the essential oil from *Ageratina jocospecana* and its repellent effect on Drywood termite *Incisitermes marginipennis*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 15(1), 53-60.

Ríos, J. L., Francini, F., y Schinella, G. R. (2016). Productos naturales para el tratamiento de la diabetes (I): mecanismos de acción. *Revista de Fitoterapia*. 16(1): 17-31.

Rojas, A. D., Pardo-Novoa, J. C., Río, R. E. D., Gómez-Hurtado, M. A., Limón, D., Luna, F., y 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 Farmacéuticas*, 46(1), 64-69.

Romero-Cerecero, O., Islas-Garduño, A. L., Zamilpa, A., y Tortoriello, J. (2017). Effectiveness of *Ageratina pichinchensis* Extract in Patients with Vulvovaginal Candidiasis. A Randomized, Double-Blind, and Controlled Pilot Study. *Phytotherapy Research*, 31(6), 885-890.

Romero-Cerecero, O., Rojas, G., Navarro, V., Herrera-Arellano, A., Zamilpa-Álvarez, A., y Tortoriello, J. (2006). Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Ageratina pichinchensis* on patients with tinea pedis: An explorative pilot study controlled with ketoconazole. *Planta medica*, 72(14), 1257-1261.

Romero-Cerecero, O., Zamilpa-Álvarez, A., Jiménez-Ferrer, E., y Tortoriello, J. (2012). Exploratory study on the effectiveness of a standardized extract from *Ageratina pichinchensis* in patients with chronic venous leg ulcers. *Planta medica*, 78(04), 304-310.

Romero-Cerecero, O., Zamilpa-Álvarez, A., Ramos-Mora, A., Alonso-Cortés, D., Jiménez-Ferrer, J. E., Huerta-Reyes, M. E., y Tortoriello, J. (2011). Effect on the wound healing process and *in vitro* cell proliferation by the medicinal Mexican plant *Ageratina pichinchensis*. *Planta medica*, 77(10), 979-983.

Rongtao, L., Zhihui, D., y Jingkai, D. (1997). Chemical constituents from *Eupatorium adenophorum*. *Acta Botanica Yunnanica*, 19(2), 196-200.

Secretaría de Salud. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.

Shahzadi, I., & Shah, M. M. (2015). Acylated flavonol glycosides from *Tagetes minuta* with antibacterial activity. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 195.

Siebertz, R., Proksch, P., y Witte, L. (1990). Accumulation and biosynthesis of the chromenes precocene I and II in *Ageratum houstonianum*. *Phytochemistry*, 29(7), 2135-2138.

Siebertz, R., Proksch, P., Wray, V., y Witte, L. (1989). Accumulation and biosynthesis of benzofurans in root cultures of *Eupatorium cannabinum*. *Phytochemistry*, 28(3), 789-793.

Solís-Quispe, L., Pino, J. A., Falco, A. S., Tomaylla-Cruz, C., Quispe-Tonccochoi, E. G., Solís-Quispe, J. A., y Solís-Quispe, A. (2019). Chemical composition and antibacterial activities of essential oil from *Ageratina pentlandiana* (DC.) RM King & H. Rob. leaves grown in the Peruvian Andes. *Journal of Essential Oil Research*, 31(5), 409-413.

Torres-Barajas, L., Rojas-Vera, J., Morales-Mendez, A., Rojas-Fermin, L., Lucena, M., y Buitrago, A. (2013). Chemical composition and evaluation of antibacterial activity of essential oils of *Ageratina jahnii* and *Ageratina pichinchensis* collected in Mérida, Venezuela. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(1), 92-98.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Consultado el 25/Mar/2020 [en línea] Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/40034279>

Upadhyay, J., Polyzos, S. A., Perakakis, N., Thakkar, B., Paschou, S. A., Katsiki, N., y Sternthal, E. (2018). Pharmacotherapy of type 2 diabetes: an update. *Metabolism*, 78, 13-42.

Van den Dool, H., y Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11, 463-471.

Villaseñor, J. L. (2018). Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en México. *Botanical Sciences*, 96(2), 332-358.

Wei, Y., Zhang, K., Zhang, G., y Ito, Y. (2011). Isolation of five bioactive components from *Eupatorium adenophorum* Spreng using stepwise elution by high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34(20), 2505-2515.

Weyerstahl, P., Marschall, H., Seelmann, I., y Kaul, V. K. (1997). Constituents of the flower essential oil of *Ageratina adenophora* (Spreng.) K. et R. from India. *Flavour and Fragrance Journal*, 12(6), 387-396.

Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clinical Biochemist Reviews*, 26(2), 19.

Xu, H. (2010). Inhibition kinetics of flavonoids on yeast  $\alpha$ -glucosidase merged with docking simulations. *Protein and Peptide Letters*, 17(10), 1270-1279.

Yamaguchi, S., Muro, S., Kobayashi, M., Miyazawa, M., y Hirai, Y. (2003). Absolute structures of some naturally occurring isopropenyldihydrobenzofurans, remirol, remiridiol, angenomalin, and isoangenomalin. *The Journal of Organic Chemistry*, 68(16), 6274-6278.

Yamamoto, K., Miyake, H., Kusunoki, M., y Osaki, S. (2010). Crystal structures of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae* and in complex with its competitive inhibitor maltose. *The FEBS Journal*, 277(20), 4205-4214.

Yin, Z., Zhang, W., Feng, F., Zhang, Y., & Kang, W. (2014).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness*, 3(3-4), 136-174.

Yu, S., Fang, N., & Mabry, T. J. (1986). Flavonoids from *Ageratina saltillensis*. *Journal of Natural Products*, 49(6), 1178-1179.

Zhou, Z. Y., Liu, W. X., Pei, G., Ren, H., Wang, J., Xu, Q. L., y Tan, J. W. (2013). Phenolics from *Ageratina adenophora* roots and their phytotoxic effects on *Arabidopsis thaliana* seed germination and seedling growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(48), 11792-11799.

## 10. ANEXOS

<b>Anexo 1. Espectros de RMN e IR</b> .....	<b>83</b>
Figura S1. Espectro HSQC de <b>108</b> en CDCl <sub>3</sub> .....	<b>83</b>
Figura S2. Espectro COSY de <b>108</b> en CDCl <sub>3</sub> .....	<b>84</b>
Figura S3. Espectro HMBC de <b>108</b> en CDCl <sub>3</sub> .....	<b>85</b>
Figura S4. Espectro IR de <b>108</b> . .....	<b>86</b>
Figura S5. Espectro <sup>1</sup> H-RMN de <b>23</b> en CDCl <sub>3</sub> .....	<b>87</b>
Figura S6. Espectro <sup>13</sup> C-RMN de <b>23</b> en CDCl <sub>3</sub> .....	<b>88</b>
Figura S7. Espectro IR de <b>23</b> .....	<b>89</b>
Figura S8. Espectro <sup>1</sup> H-RMN de <b>24</b> en CDCl <sub>3</sub> .....	<b>90</b>
Figura S9. Espectro <sup>13</sup> C-RMN de <b>24</b> en CDCl <sub>3</sub> .....	<b>91</b>
Figura S10. Espectro IR de <b>24</b> en CDCl <sub>3</sub> .....	<b>92</b>
Figura S11. Espectro <sup>1</sup> H-RMN de <b>25</b> en CDCl <sub>3</sub> .....	<b>93</b>
Figura S12. Espectro <sup>13</sup> C-RMN de <b>25</b> en CDCl <sub>3</sub> .....	<b>94</b>
Figura S13. Espectro IR de <b>25</b> .....	<b>95</b>
Figura S14. Espectro <sup>1</sup> H-RMN de <b>32</b> en CDCl <sub>3</sub> .....	<b>96</b>
Figura S15. Espectro <sup>13</sup> C-RMN de <b>32</b> en CDCl <sub>3</sub> .....	<b>97</b>
Figura S16. Espectro IR de <b>32</b> .....	<b>98</b>
Figura S17. Espectro <sup>1</sup> H-RMN de <b>105</b> en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	<b>99</b>
Figura S18. Espectro <sup>13</sup> C-RMN de <b>105</b> en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	<b>100</b>
Figura S19. Espectro IR de <b>105</b> .....	<b>101</b>
Figura S20. Espectro <sup>1</sup> H-RMN de <b>106</b> en CD <sub>3</sub> OD .....	<b>102</b>
Figura S21. Espectro <sup>13</sup> C-RMN de <b>106</b> en CD <sub>3</sub> OD .....	<b>103</b>
Figura S22. Espectro IR de <b>106</b> .....	<b>104</b>
Figura S23. Espectro <sup>1</sup> H-RMN de <b>107</b> en CD <sub>3</sub> OD .....	<b>105</b>
Figura S24. Espectro <sup>13</sup> C-RMN de <b>107</b> en CD <sub>3</sub> OD .....	<b>106</b>
Figura S25. Espectro IR de <b>107</b> .....	<b>107</b>
Figura S26. Espectro <sup>1</sup> H-RMN de <b>26</b> en CDCl <sub>3</sub> .....	<b>108</b>
<b>Anexo 2. Espectros de masas (IE)</b> .....	<b>109</b>
Figura S27. Espectro de masas (IE) de α-felandreno.....	<b>109</b>
Figura S28. Espectro de masas (IE) de o-cimeno .....	<b>109</b>
Figura S29. Espectro de masas (IE) de fenilacetaldehído.....	<b>109</b>
Figura S30. Espectro de masas (IE) de β-buorboneno.....	<b>110</b>
Figura S31. Espectro de masas (IE) de α-gurjuneno.....	<b>110</b>
Figura S32. Espectro de masas (IE) de cariofileno.....	<b>110</b>

Figura S33. Espectro de masas (IE) de $\alpha$ -humuleno.....	111
Figura S34. Espectro de masas (IE) de germacreno D.....	111
Figura S35. Espectro de masas (IE) de biciclogermacreno.....	111
Figura S36. Espectro de masas (IE) de palustrol.....	112
Figura S37. Espectro de masas (IE) de $\beta$ -vatiireno.....	112
Figura S38. Espectro de masas (IE) de desmetoxiencalinalina.....	112
Figura S39. Espectro de masas (IE) de $\beta$ -eudesmol.....	113
Figura S40. Espectro de masas (IE) de androencecalinol.....	113
Figura S41. Espectro de masas (IE) de encecalinol.....	113
Figura S42. Espectro de masas (IE) de encecalinalina.....	114
Figura S43. Espectro de masas (IE) de <i>O</i> -metilencecalinol.....	114
<b>Anexo 3. Tablas de cálculos computacionales.....</b>	<b>115</b>
Tabla S1. Análisis de probabilidad DP4+ en los niveles B3LYP/6-31G+(d,p).....	115
Tabla S2. Análisis de probabilidad DP4+ en los niveles mPW1PW91/6-31G+(d,p).....	116
Tabla S3. Análisis de probabilidad <i>J</i> -DP4.....	117

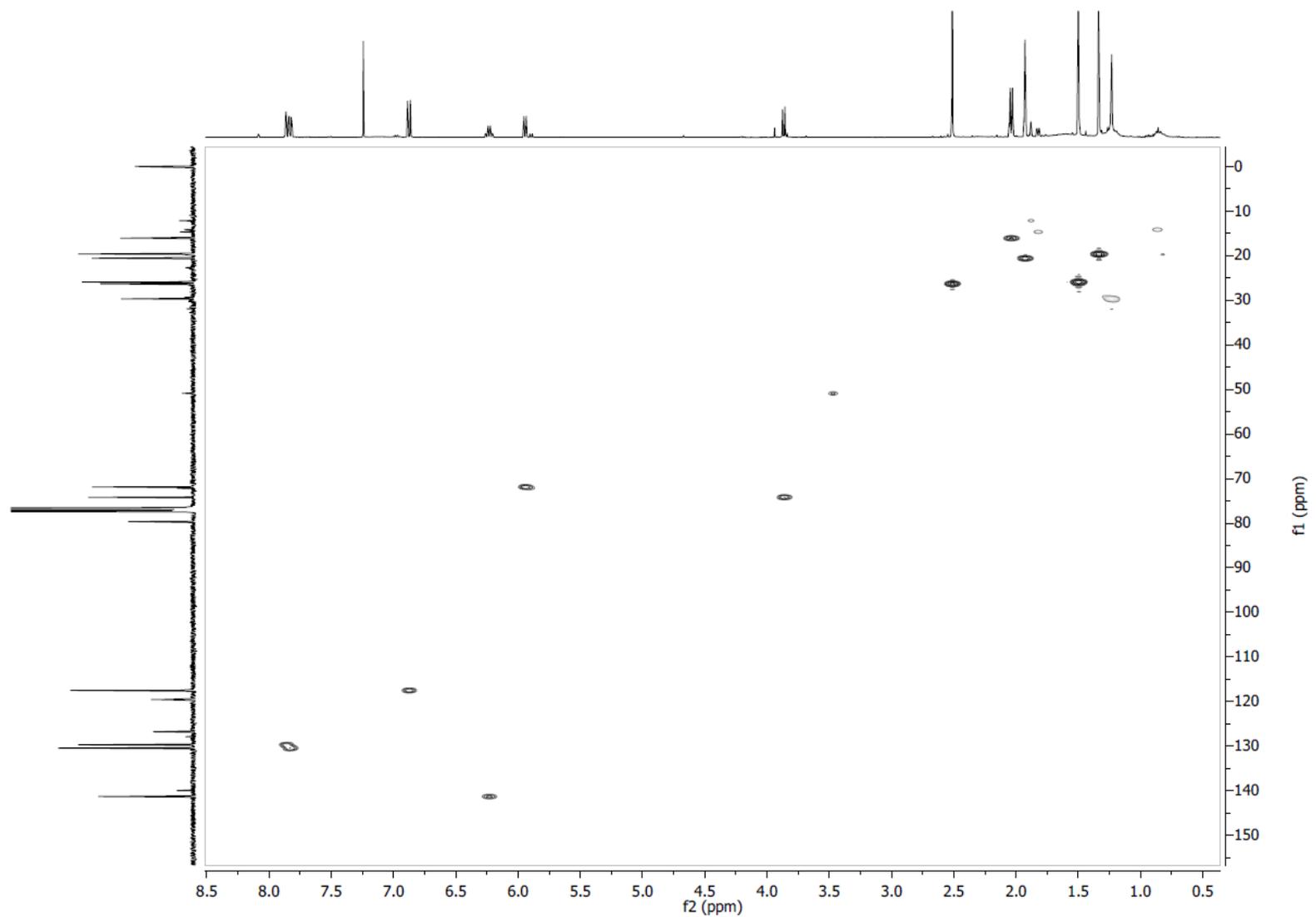


Figura S1. Espectro HSQC de 108 en CDCl<sub>3</sub>

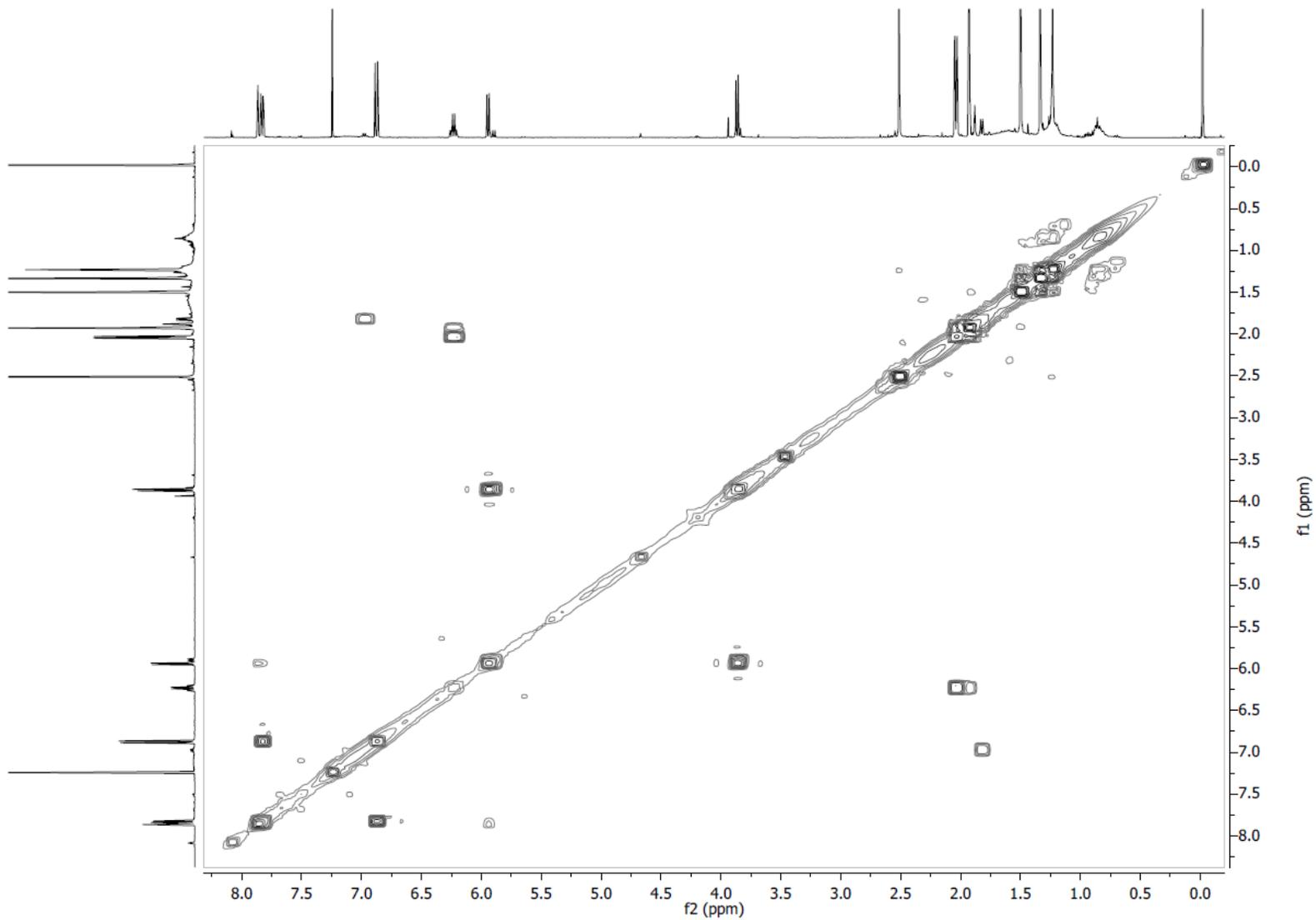


Figura S2. Espectro COSY de **108** en  $\text{CDCl}_3$

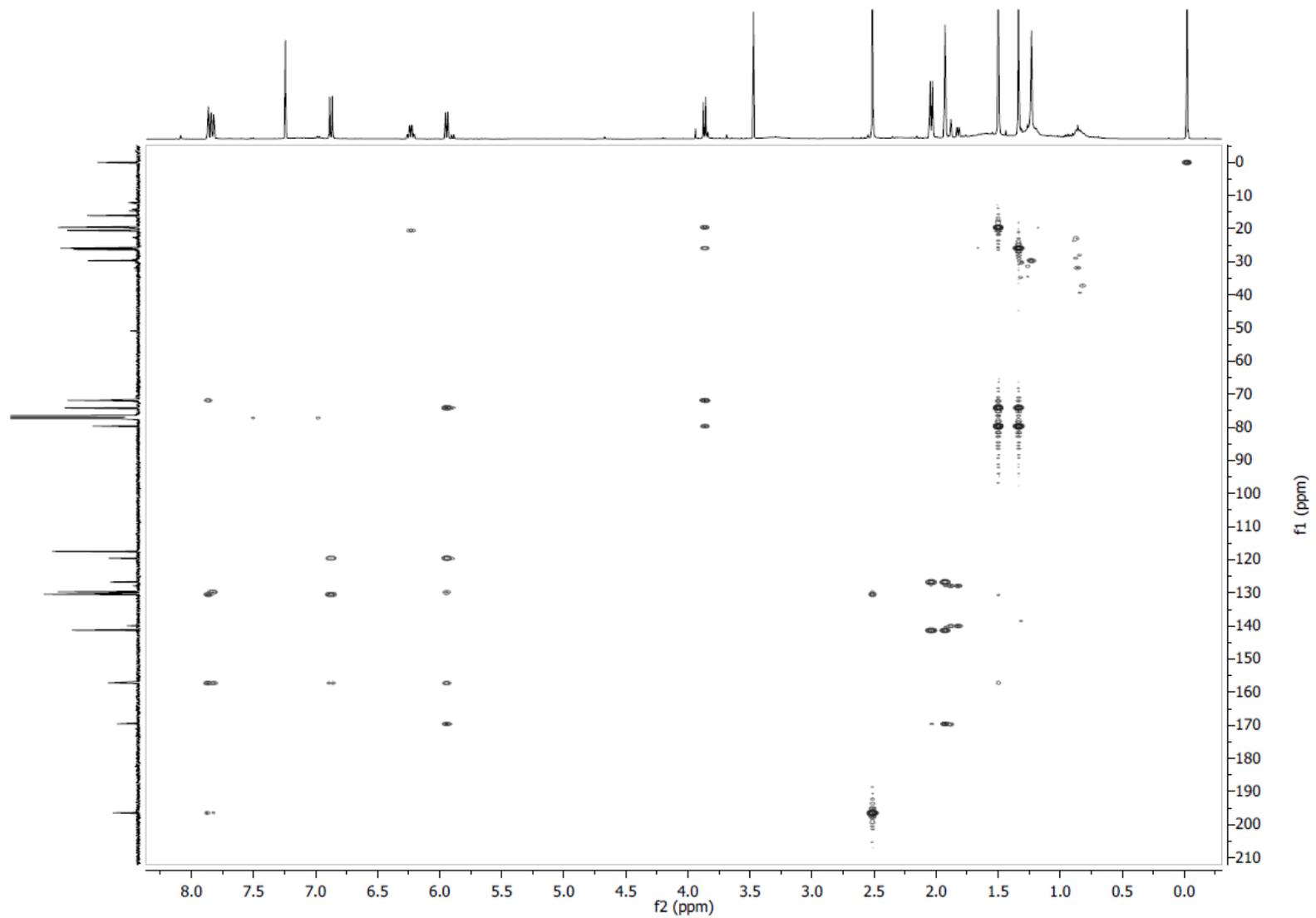


Figura S3. Espectro HMBC de **108** en  $\text{CDCl}_3$

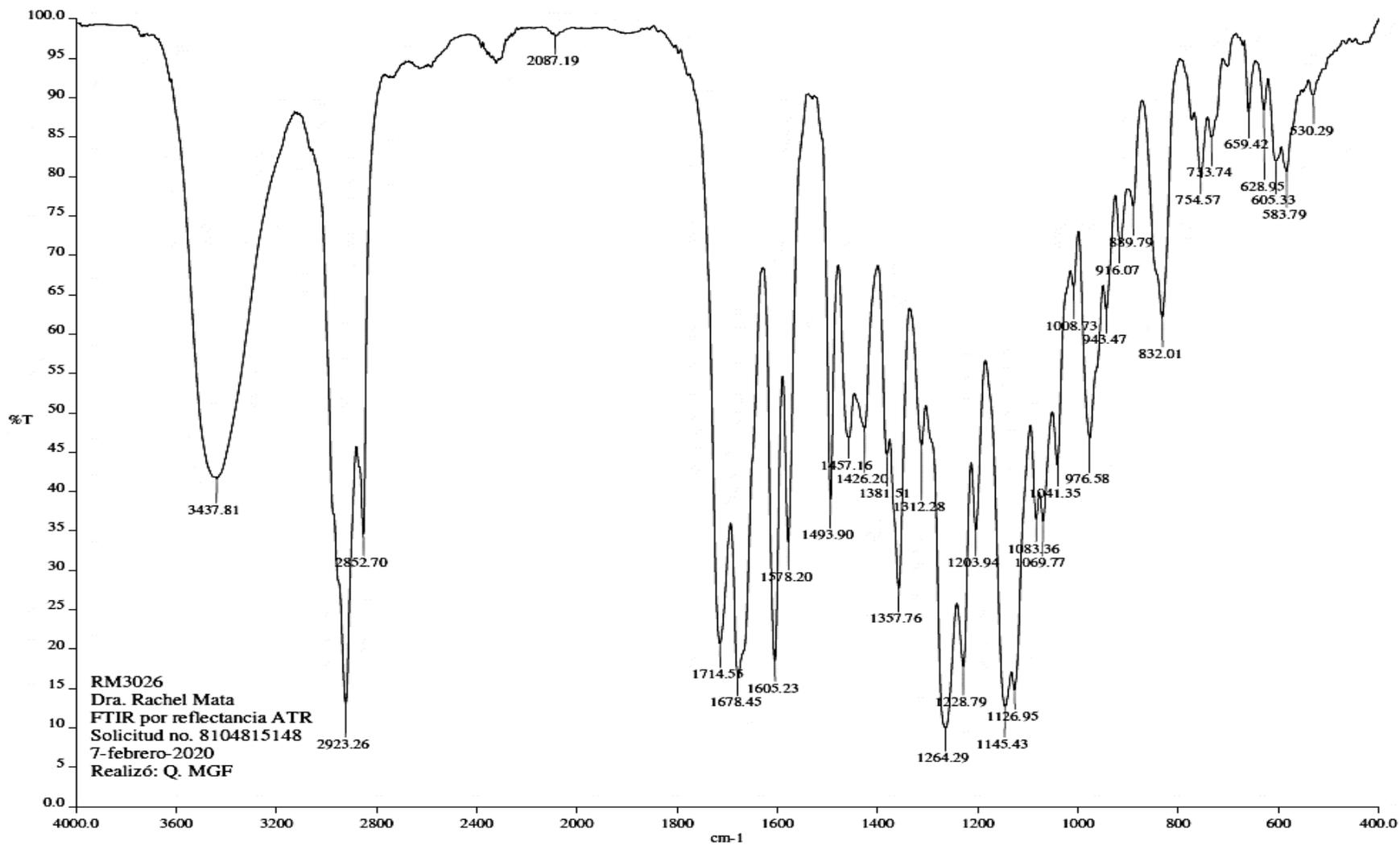


Figura S4. Espectro IR de 108.

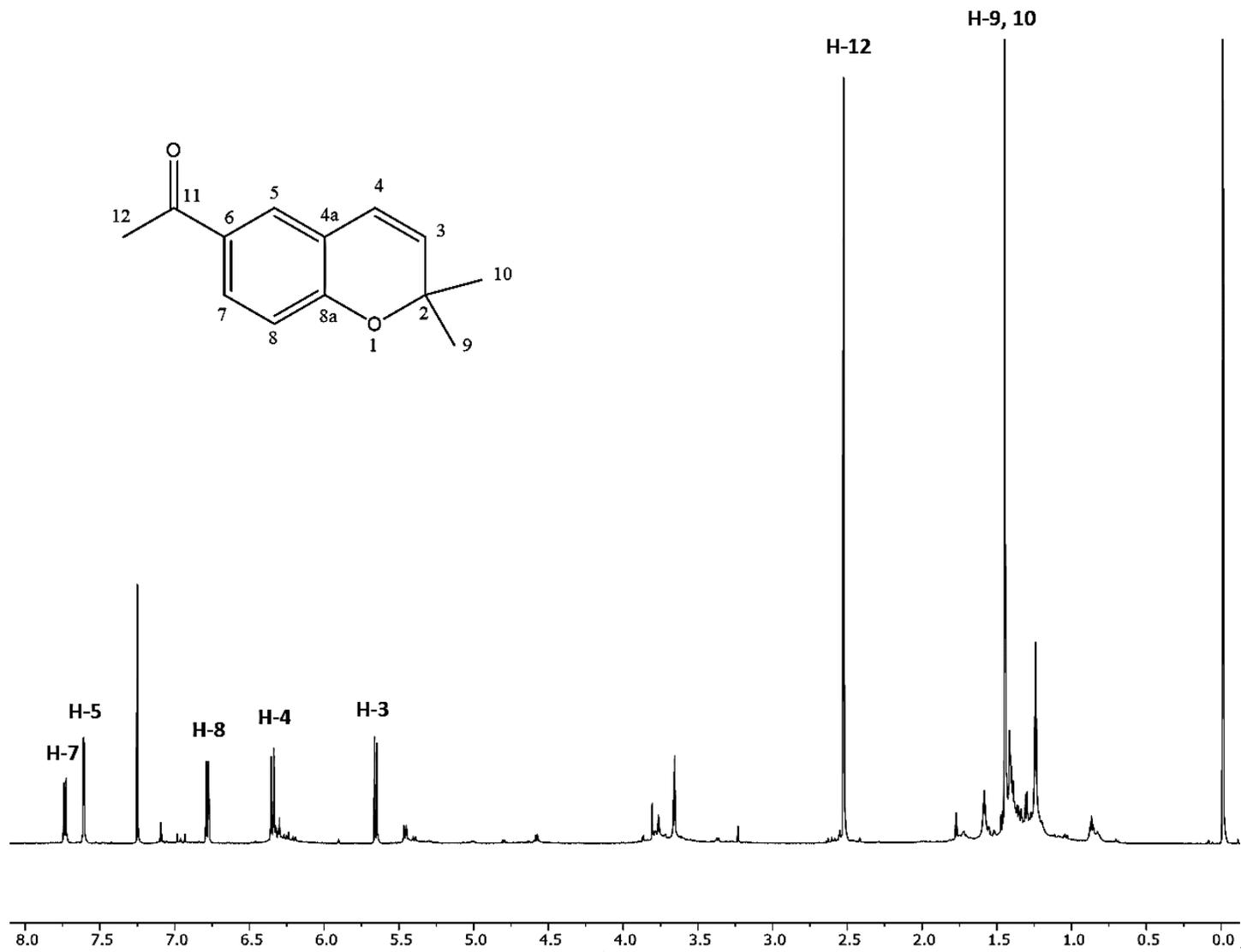


Figura S5. Espectro <sup>1</sup>H-RMN de 23 en CDCl<sub>3</sub>

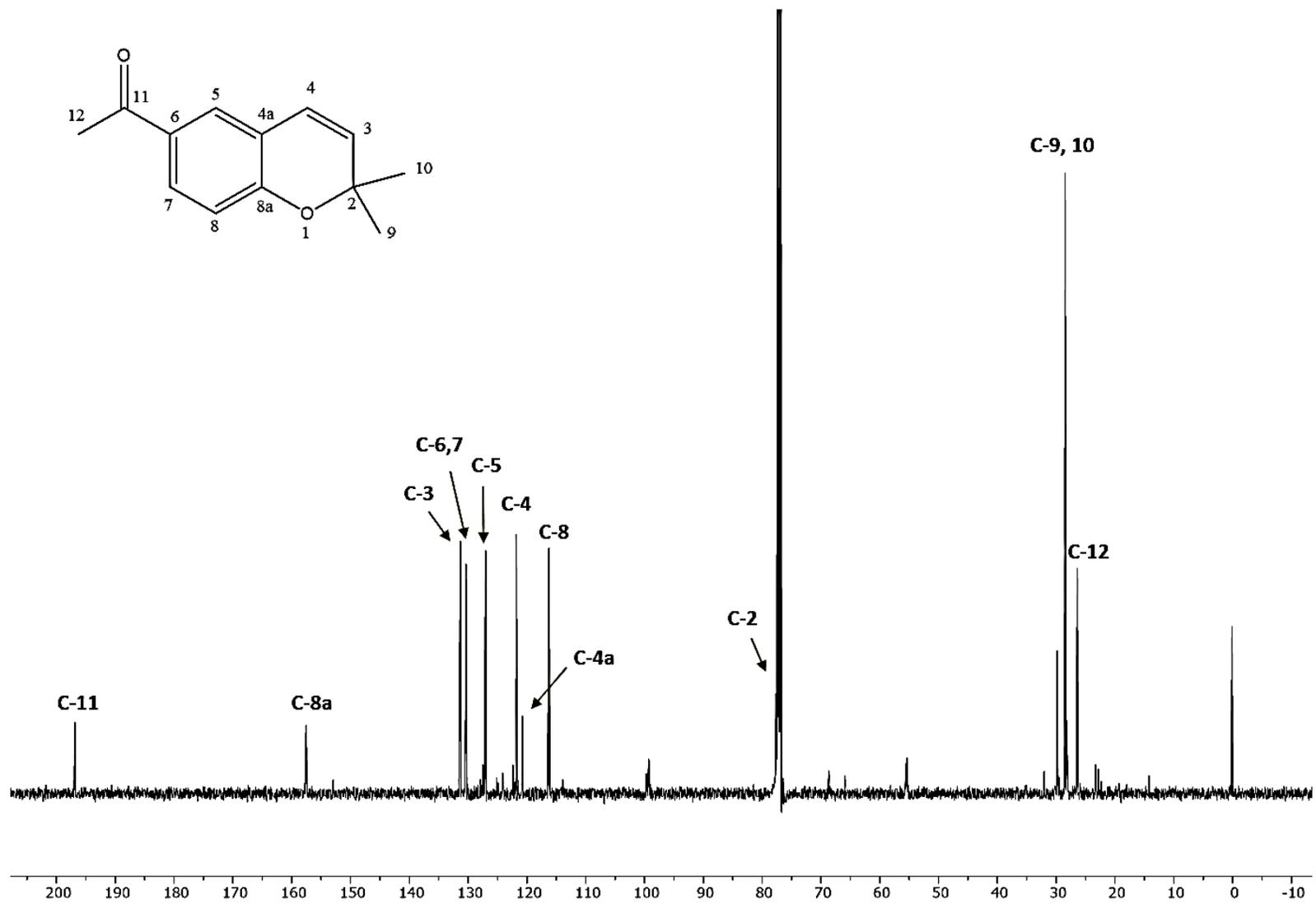


Figura S6. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de 23 en  $\text{CDCl}_3$

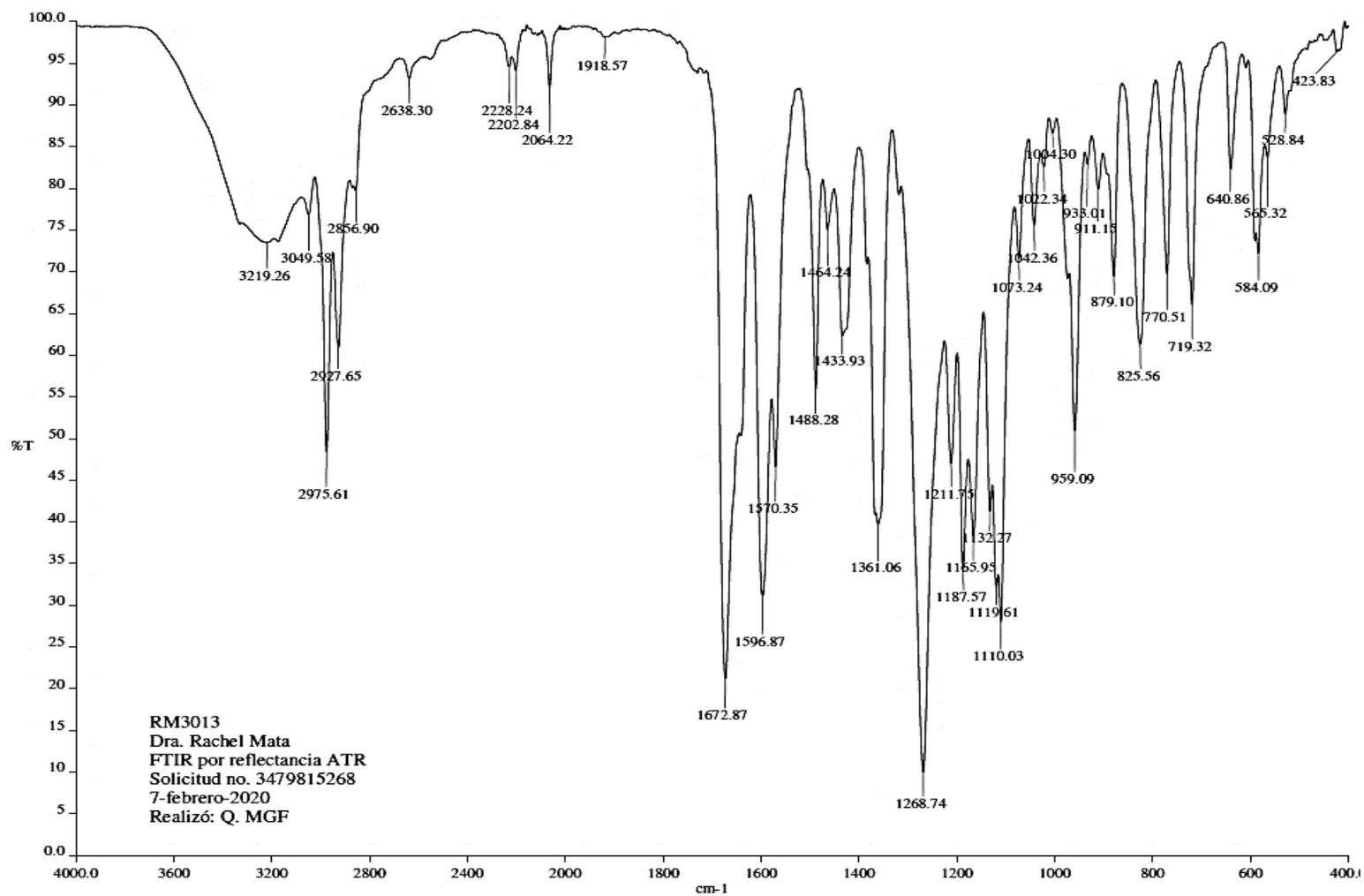


Figura S7. Espectro IR de 23.

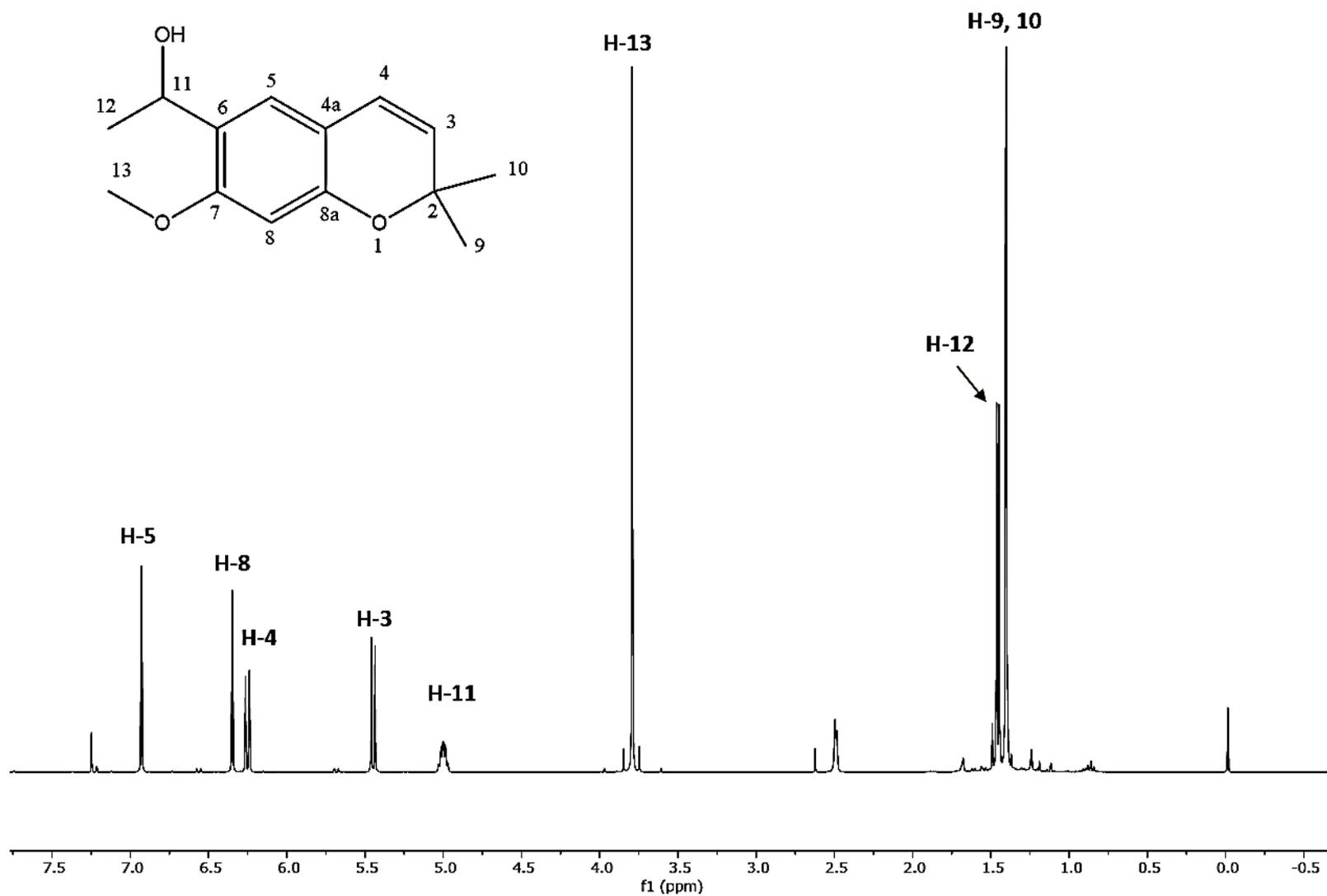


Figura S8. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  de **24** en  $\text{CDCl}_3$

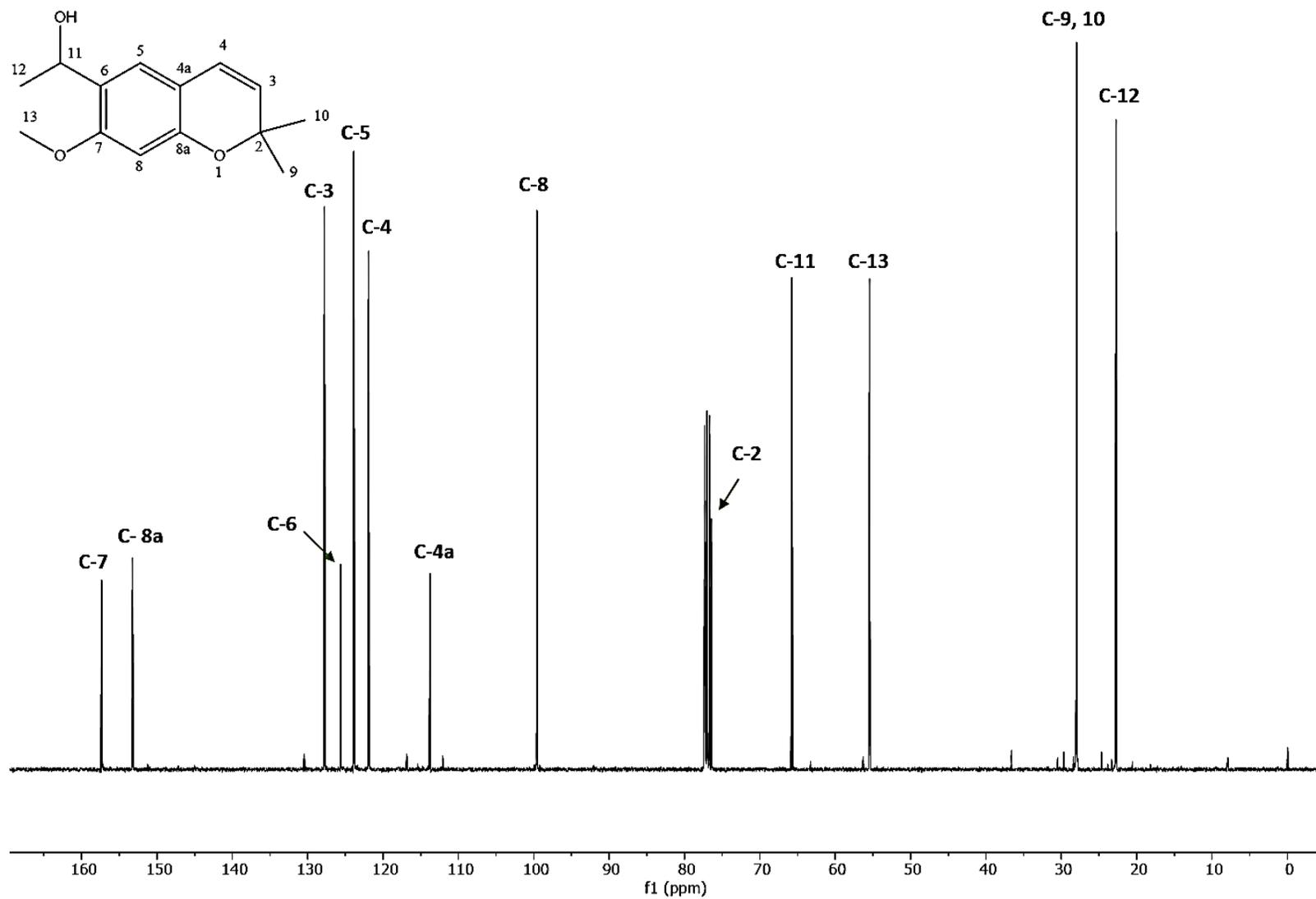


Figura S9. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de **24** en  $\text{CDCl}_3$

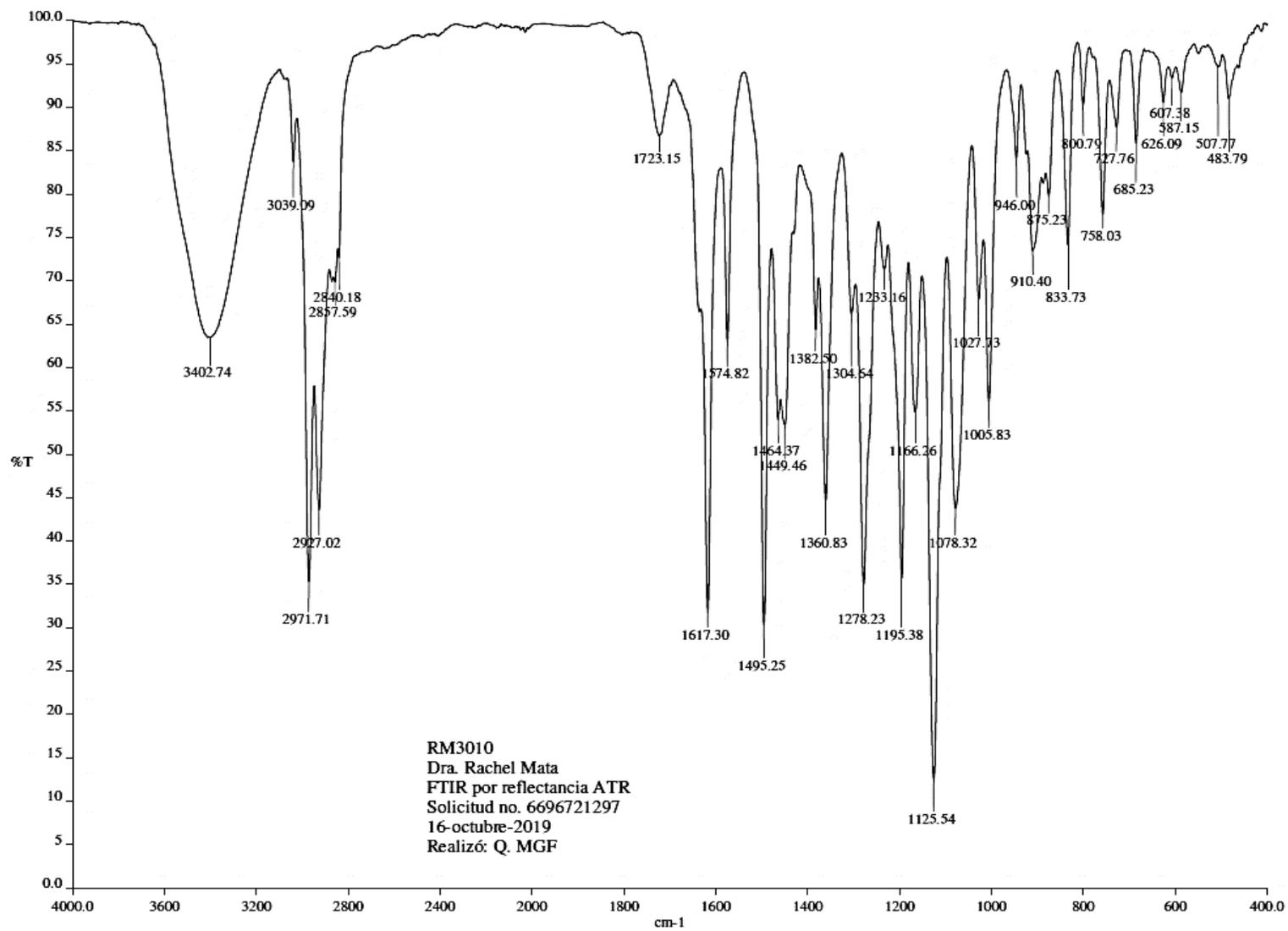


Figura S10. Espectro IR de **24** en CDCl<sub>3</sub>

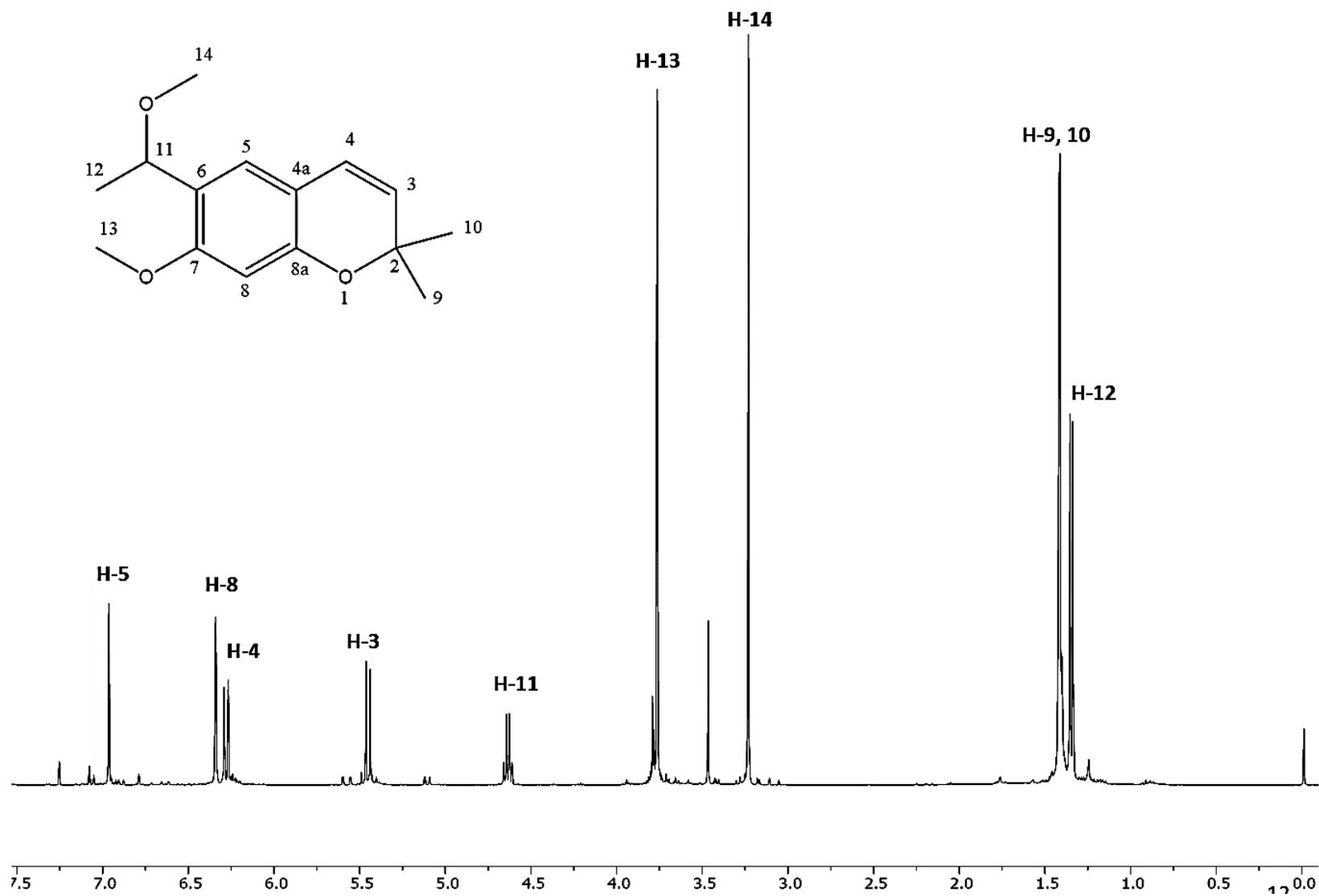


Figura S11. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **25** en  $\text{CDCl}_3$

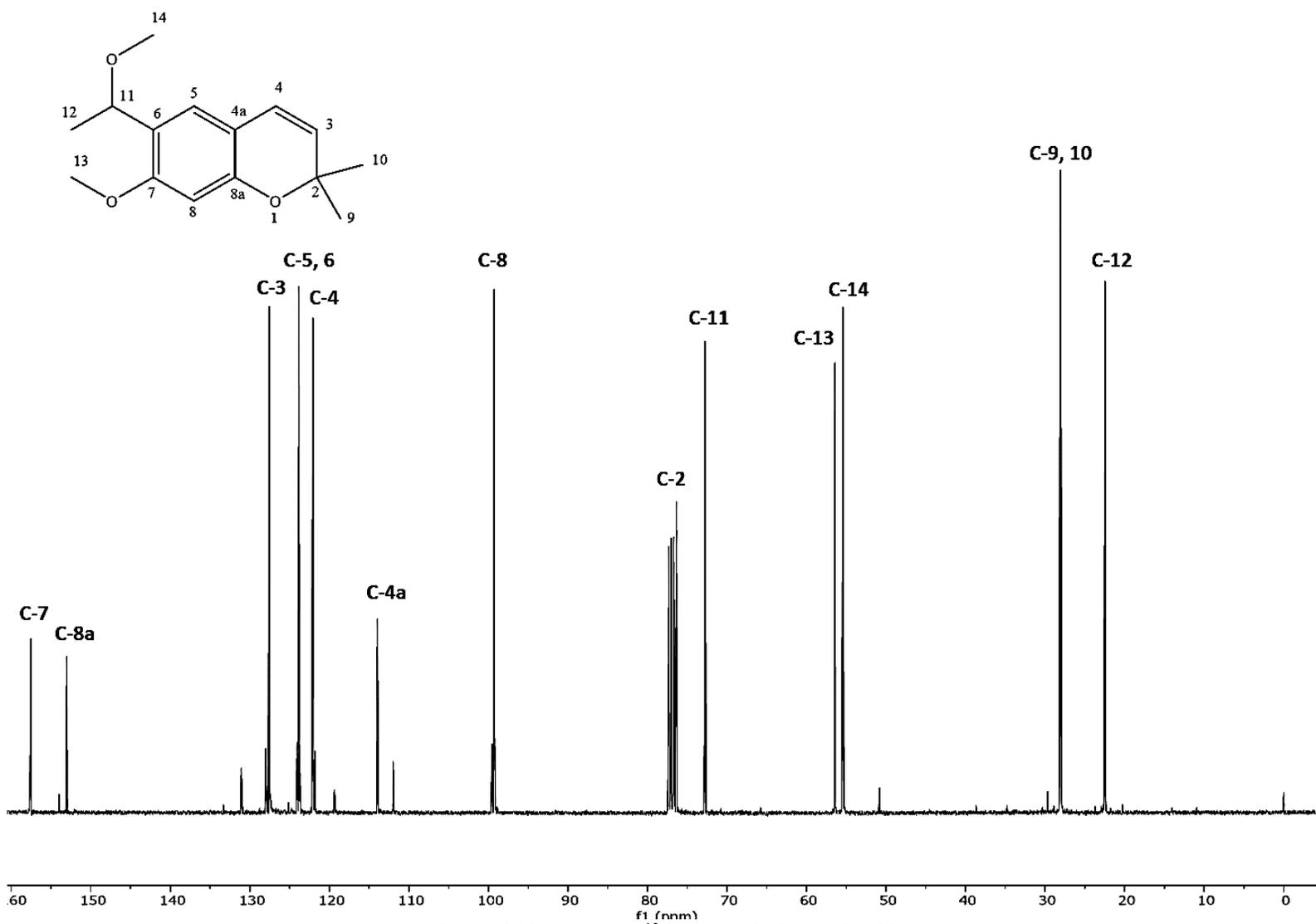


Figura S12. Espectro <sup>13</sup>C-RMN de 25 en CDCl<sub>3</sub>

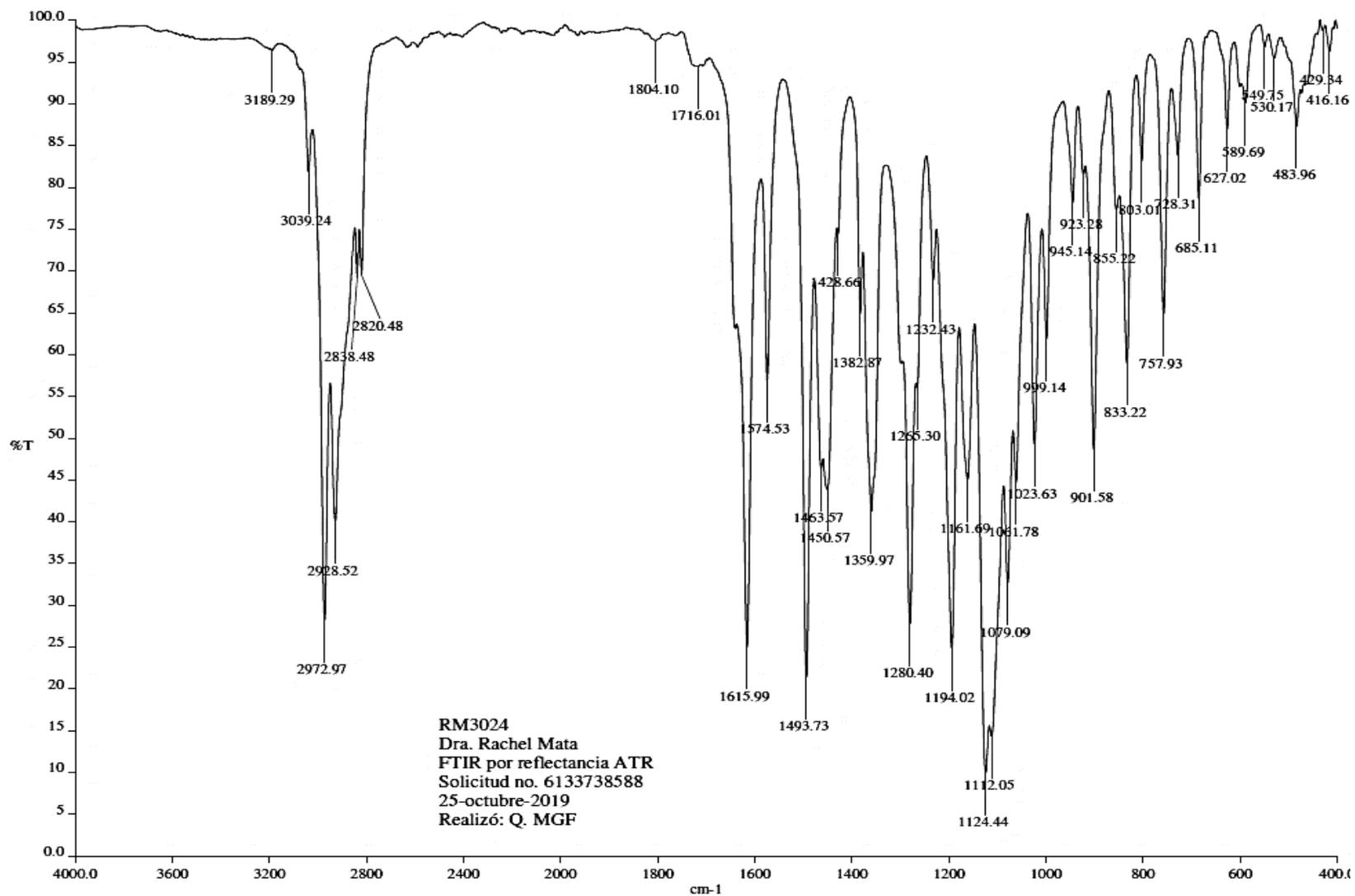


Figura S13. Espectro IR de 25.

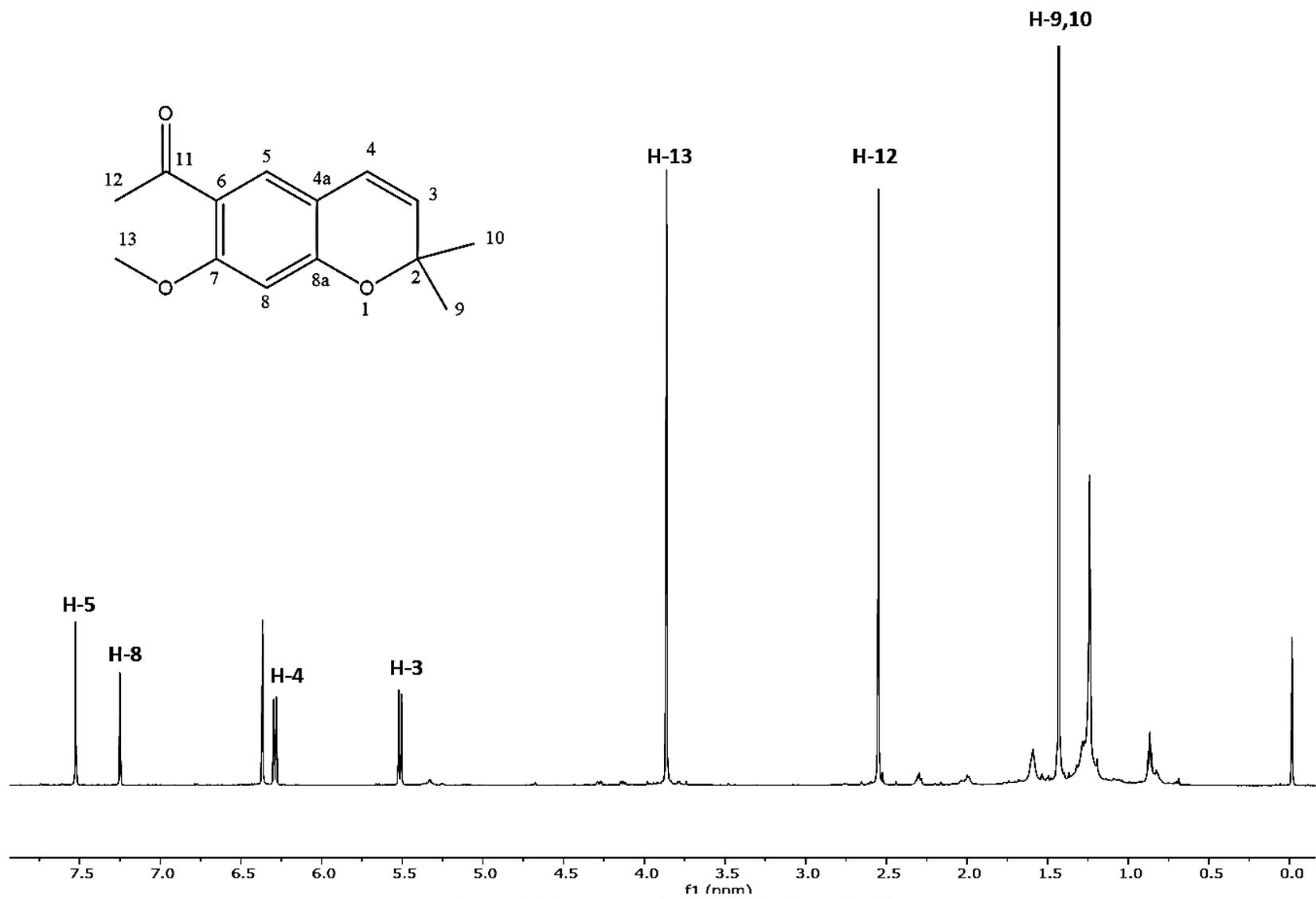


Figura S14. Espectro <sup>1</sup>H-RMN de 32 en CDCl<sub>3</sub>

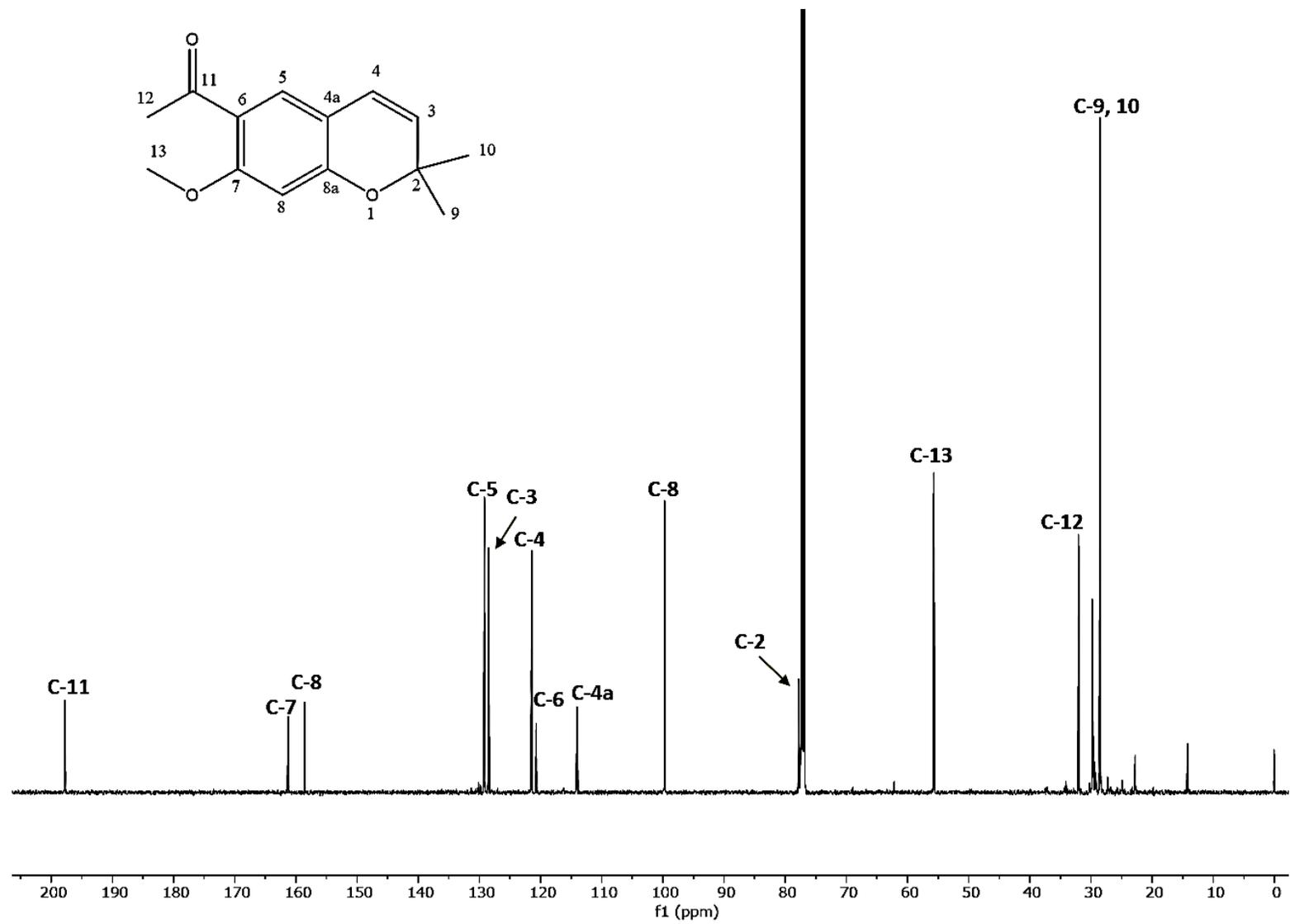


Figura S15. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de **32** en  $\text{CDCl}_3$

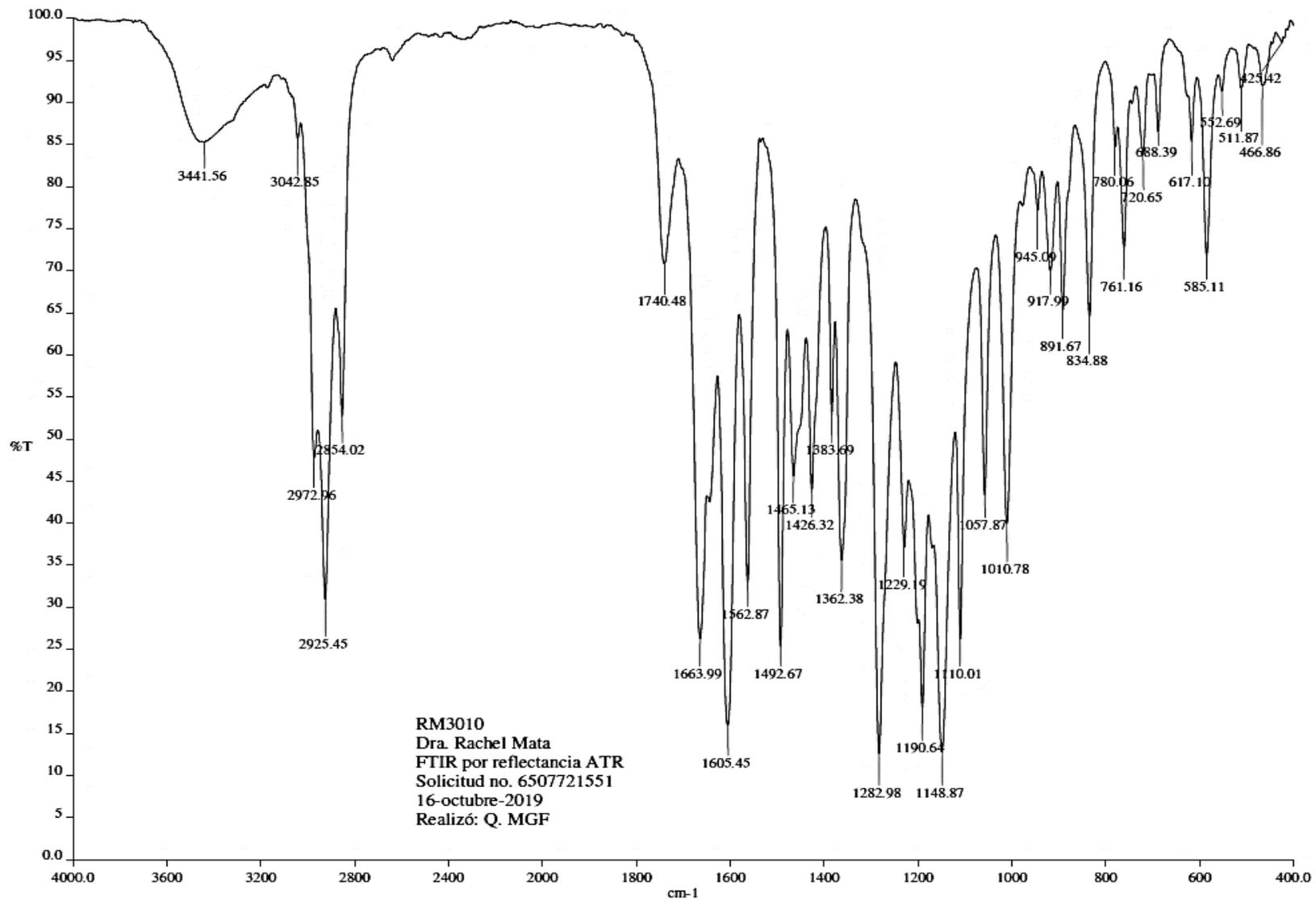


Figura S16. Espectro IR de 32

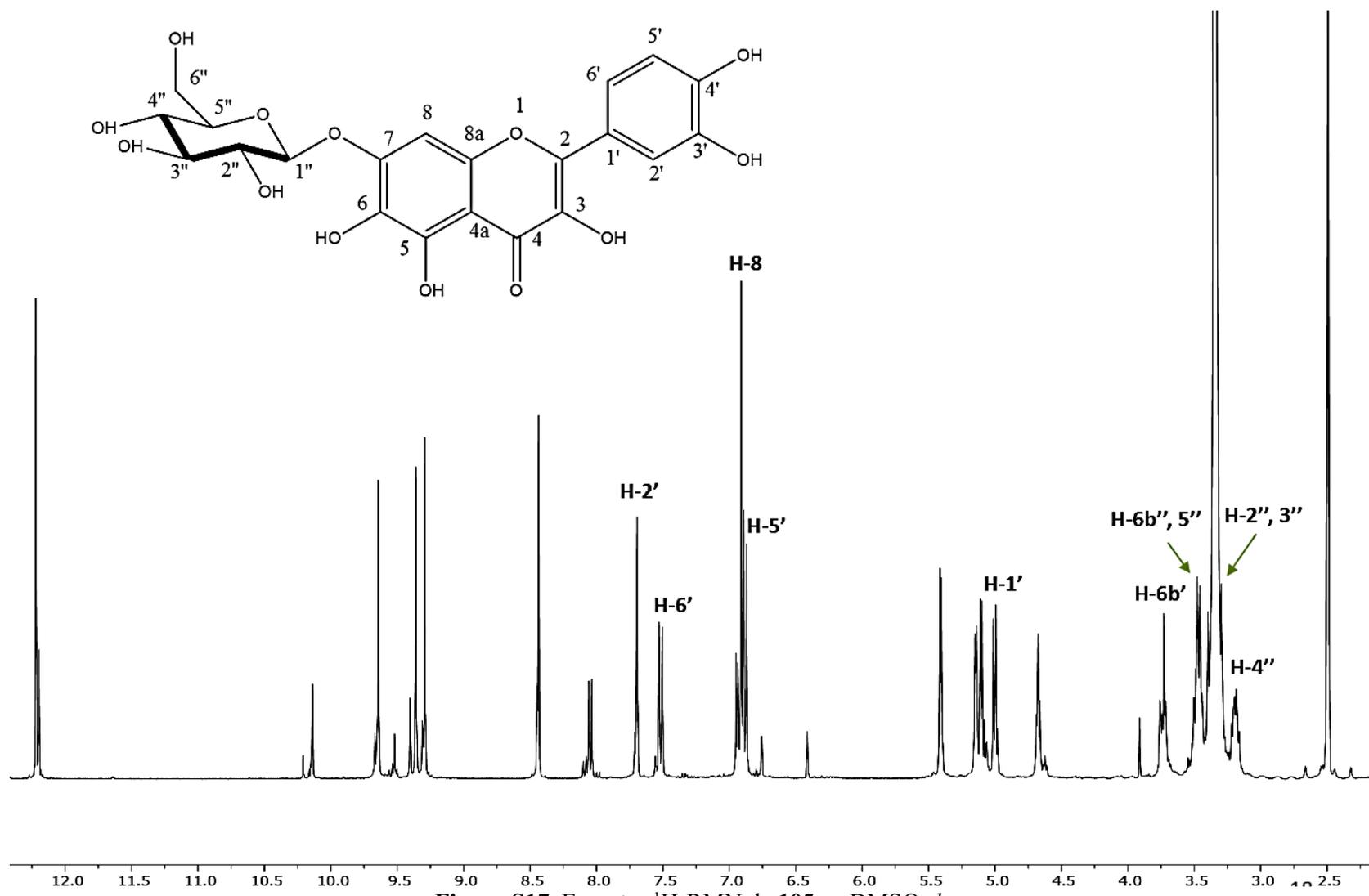


Figura S17. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  de **105** en  $\text{DMSO-}d_6$

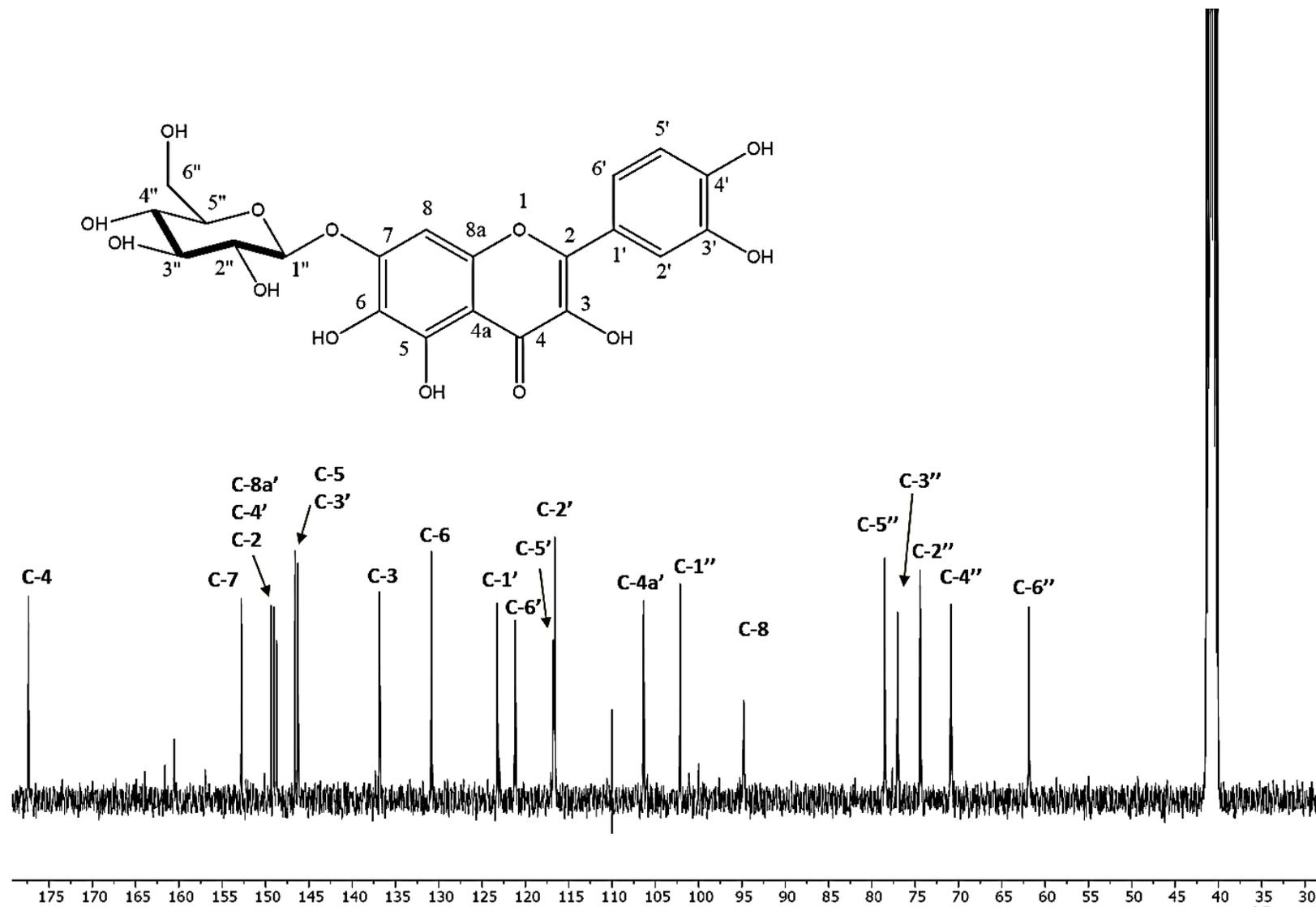


Figura S18. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de **105** en  $\text{DMSO-}d_6$

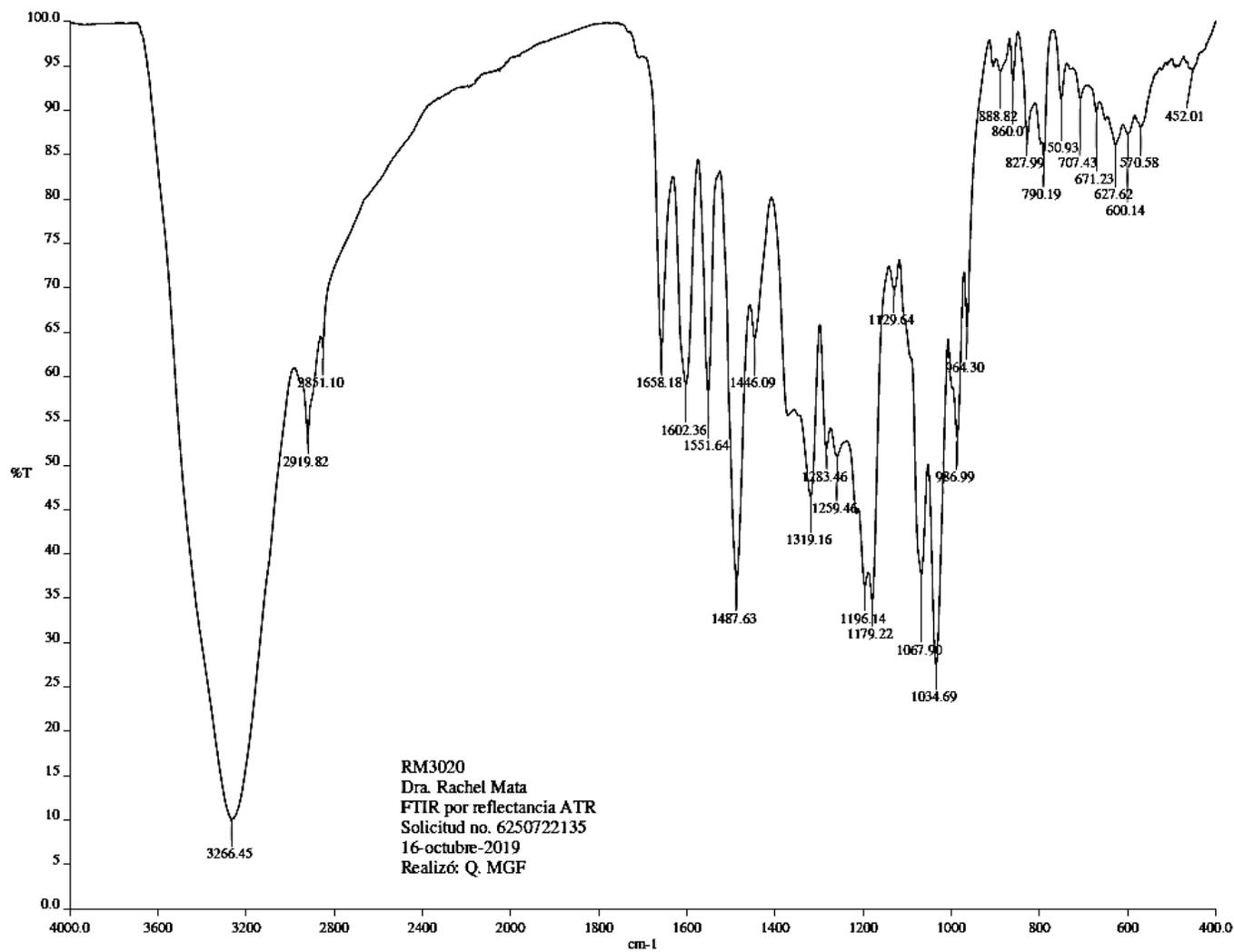
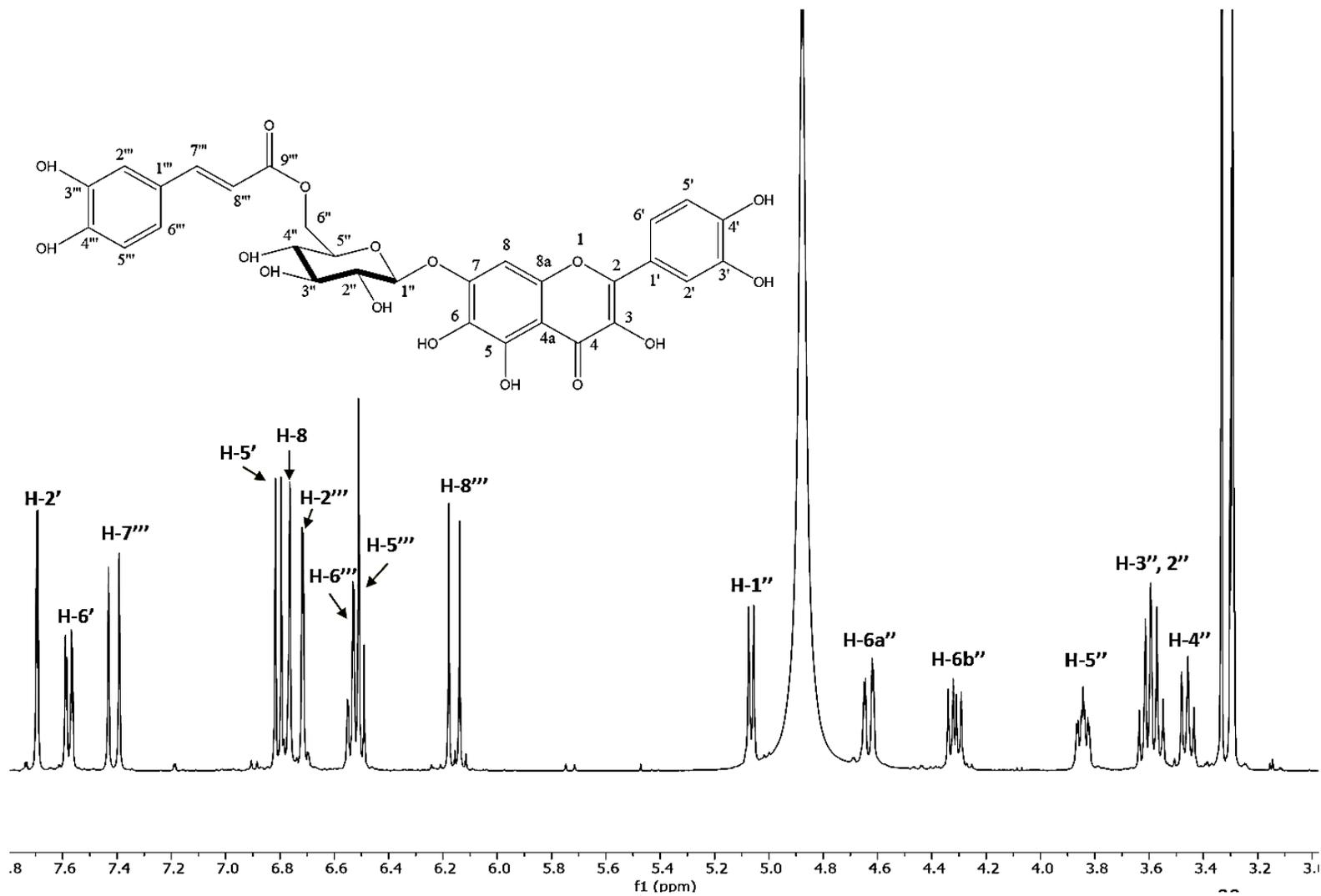


Figura S19. Espectro IR de 105



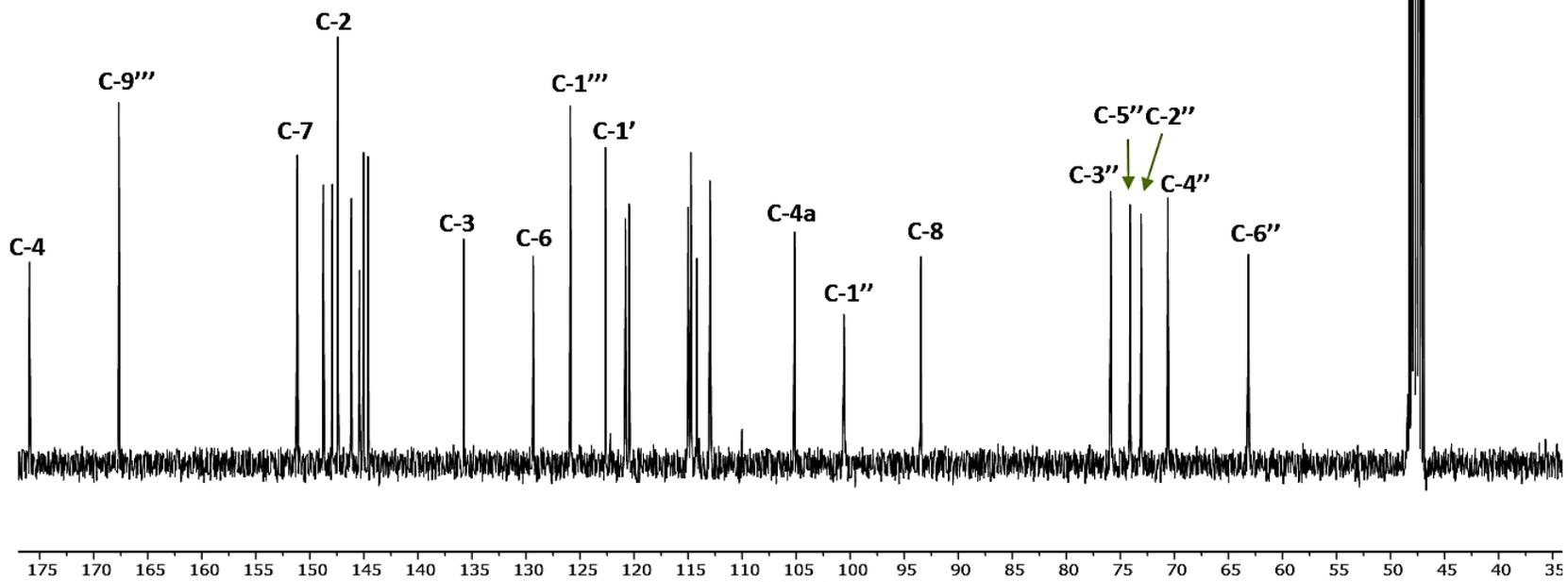
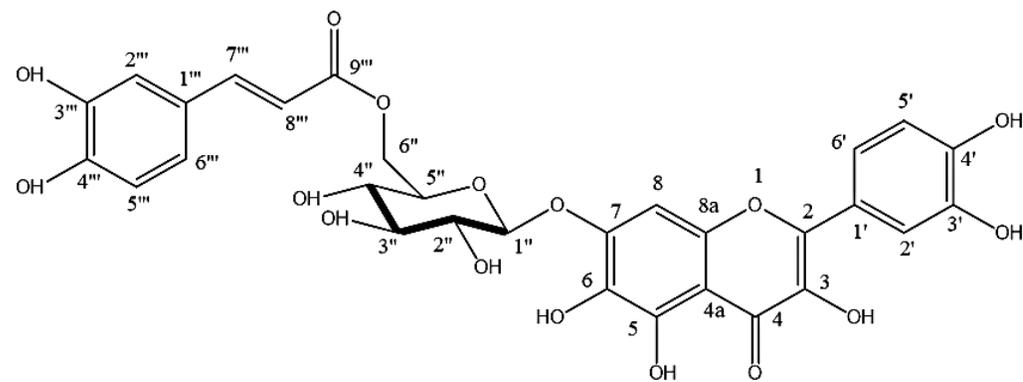


Figura S21. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de 106 en  $\text{CD}_3\text{OD}$

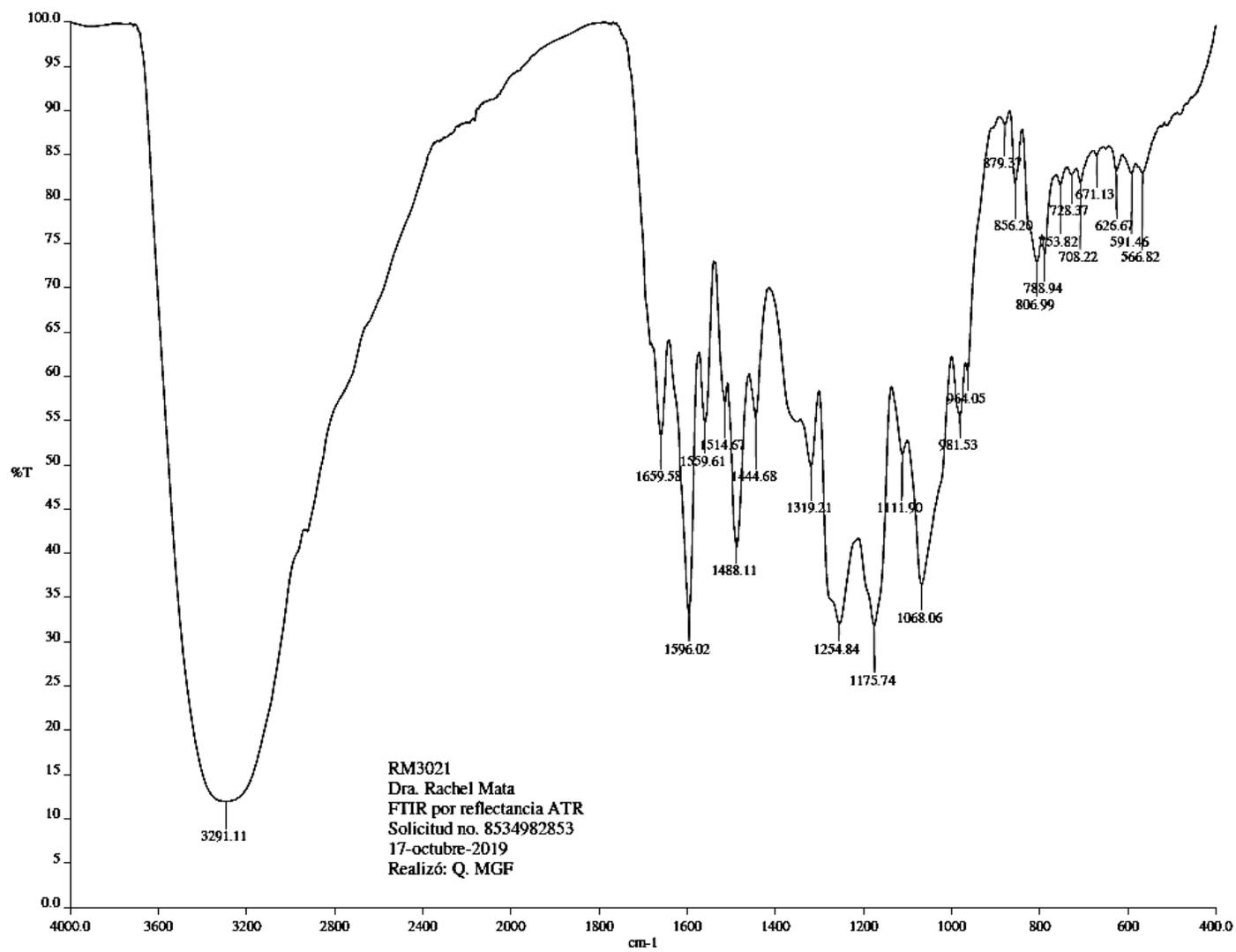
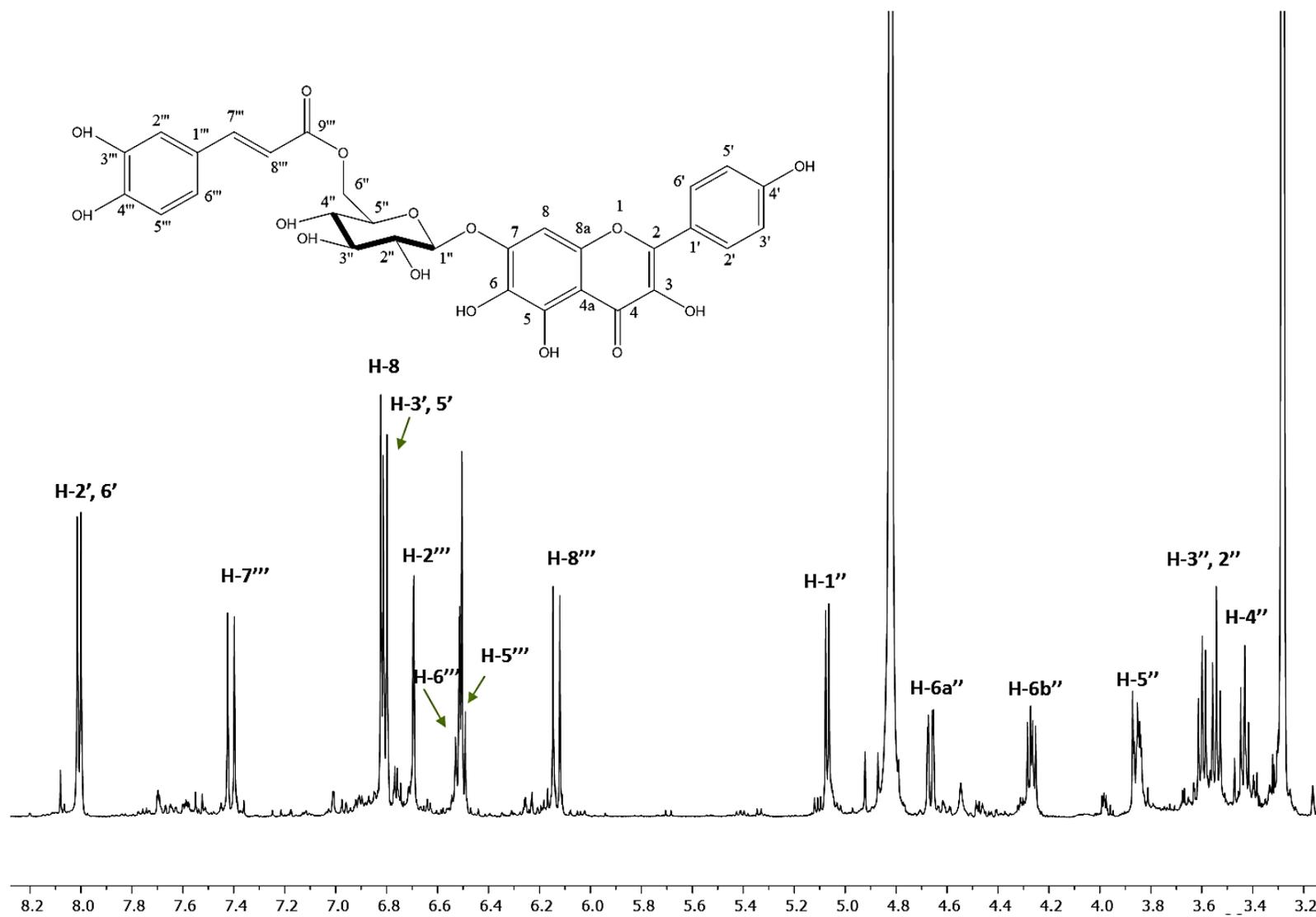


Figura S22. Espectro IR de 106



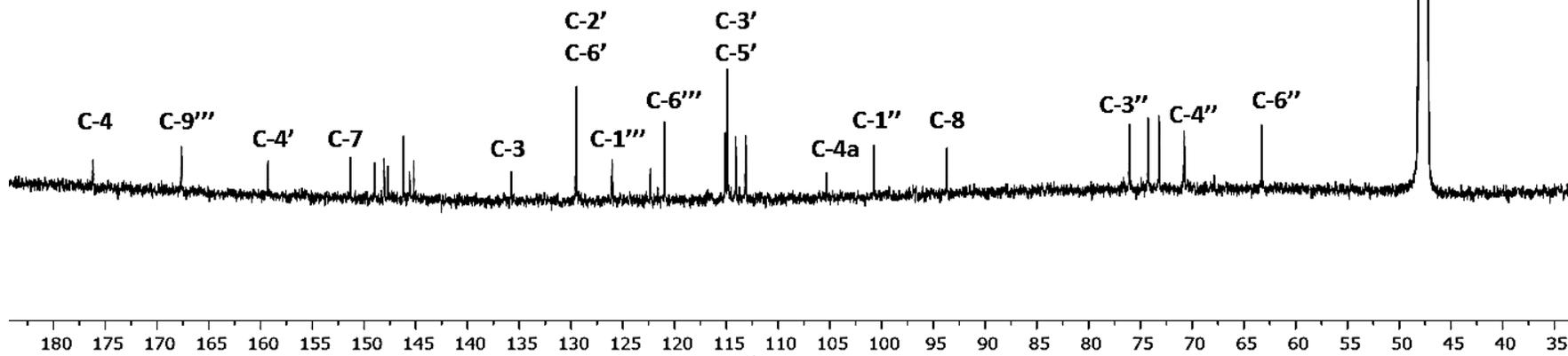
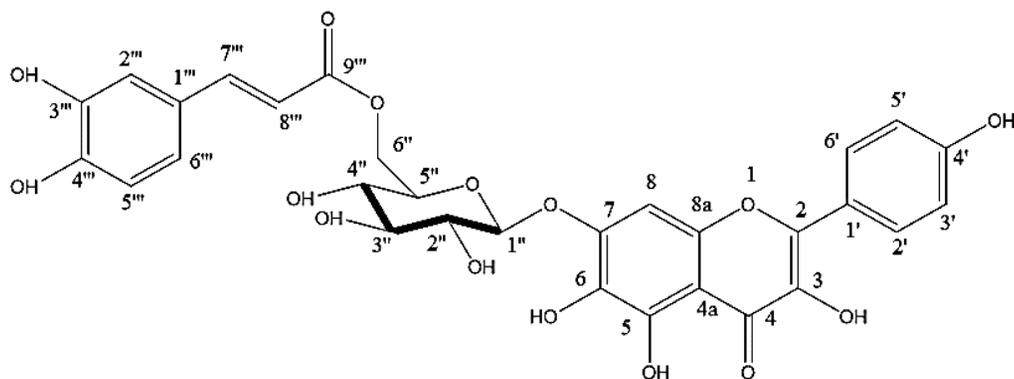


Figura S24. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de 107 en  $\text{CD}_3\text{OD}$

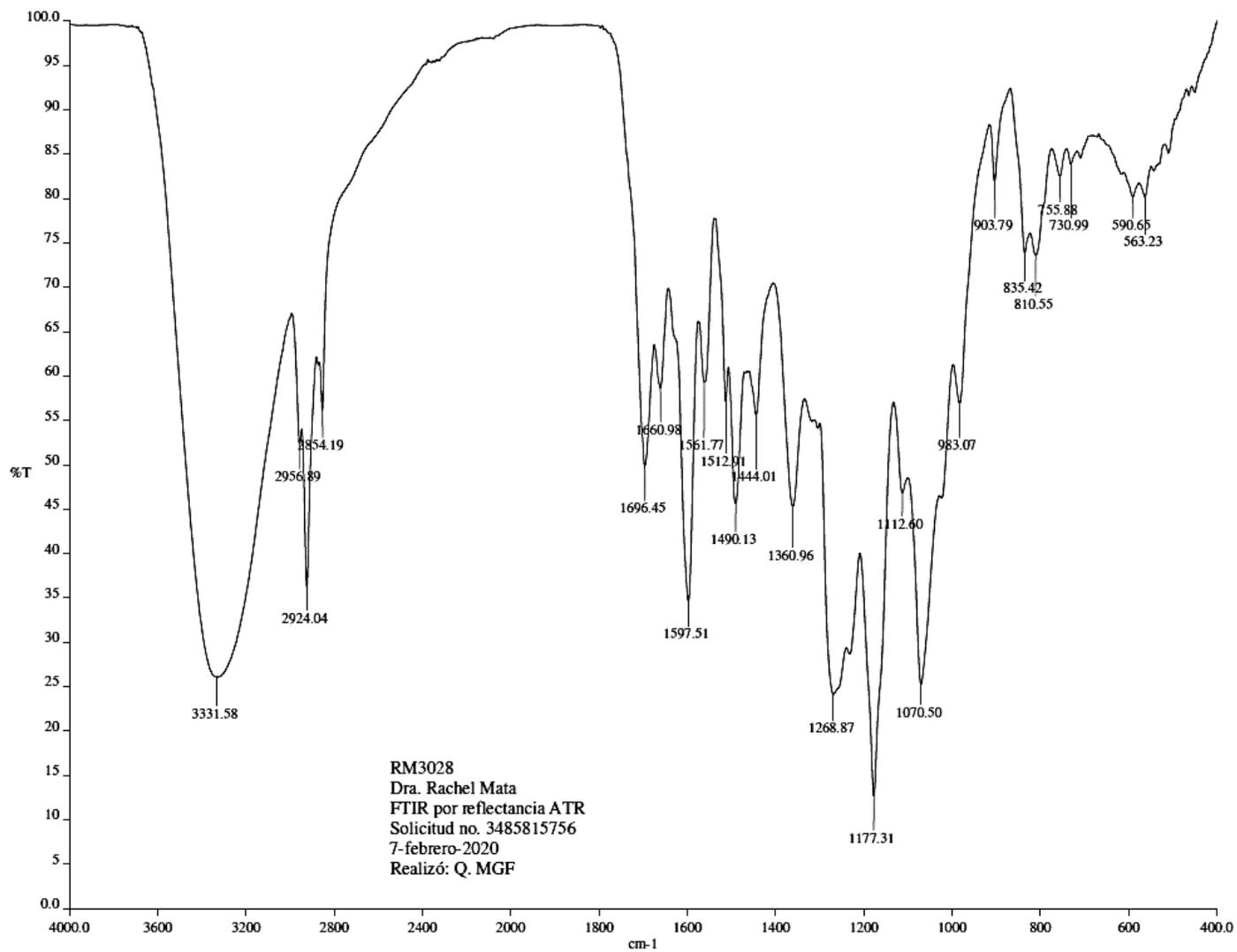


Figura S25. Espectro IR de 107

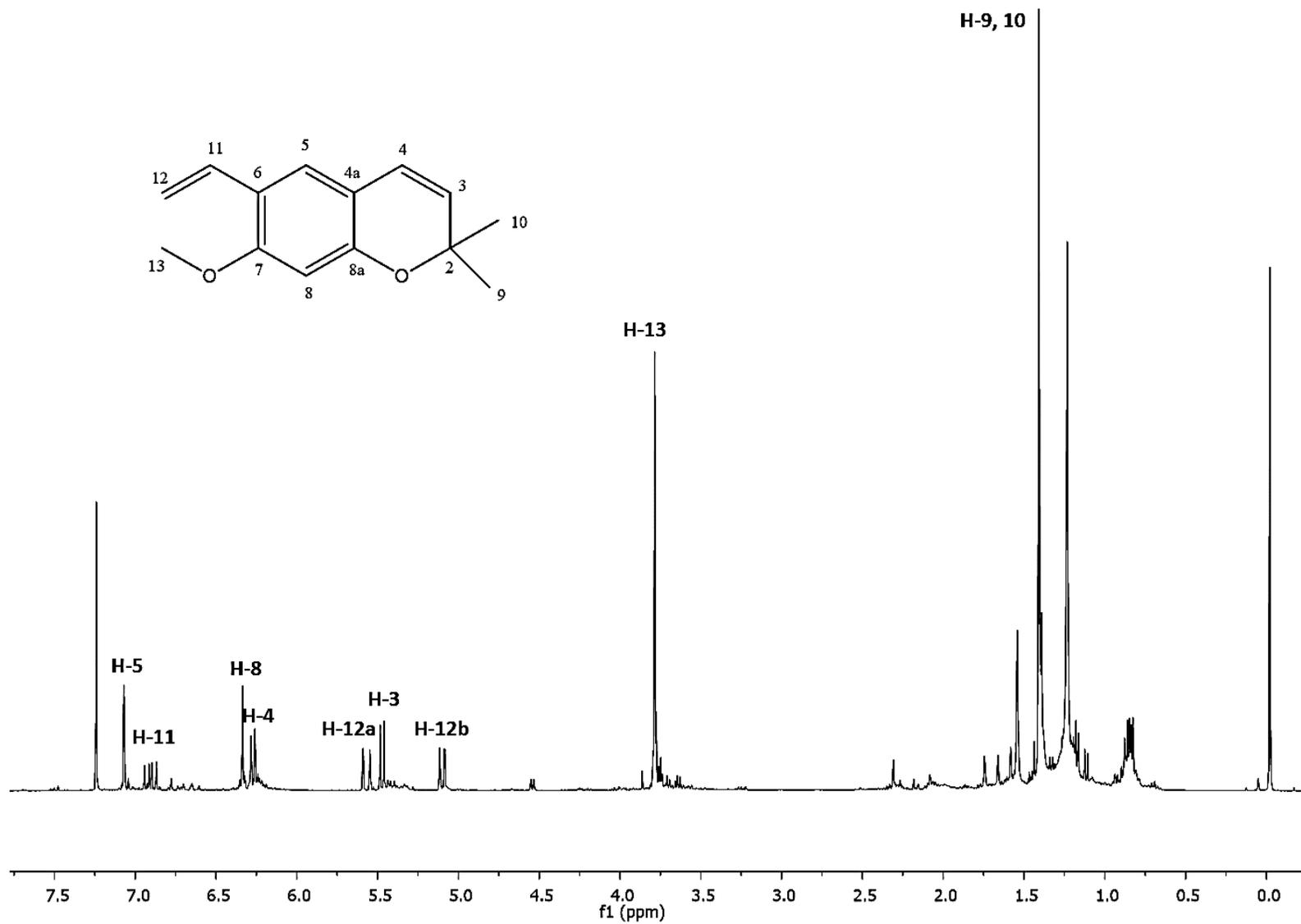
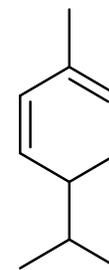
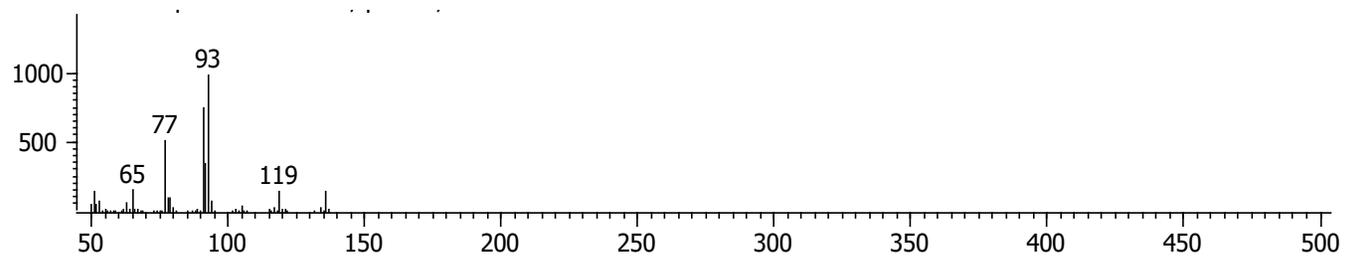
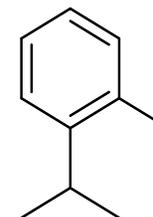
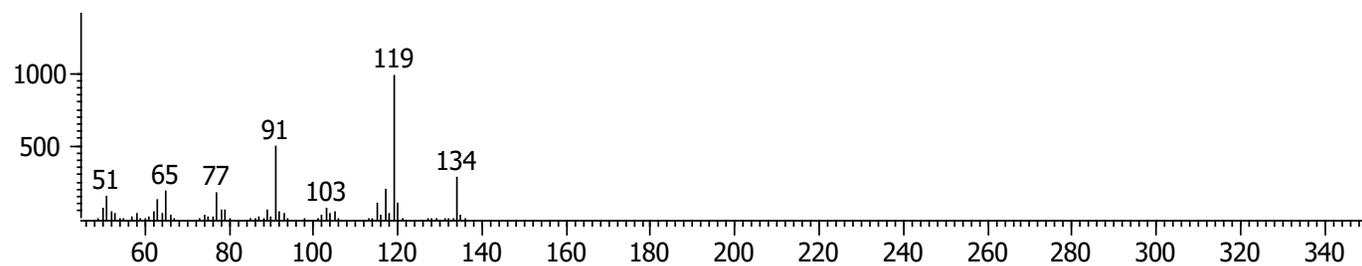


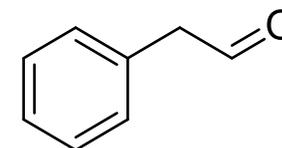
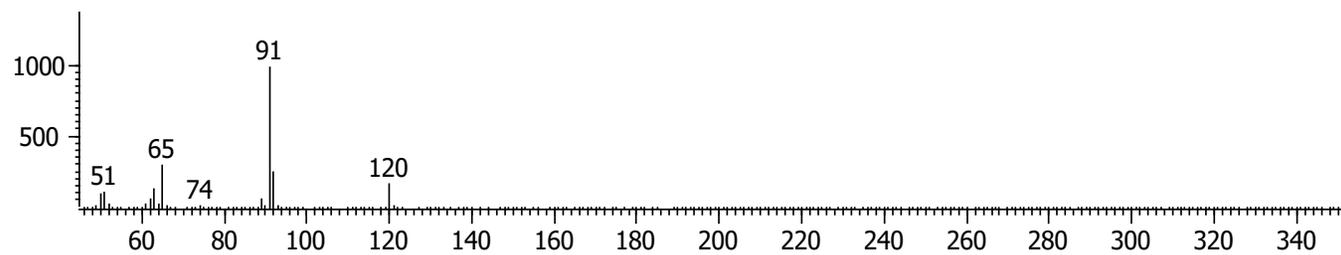
Figura S26. Espectro <sup>1</sup>H-RMN de **26** en CDCl<sub>3</sub>



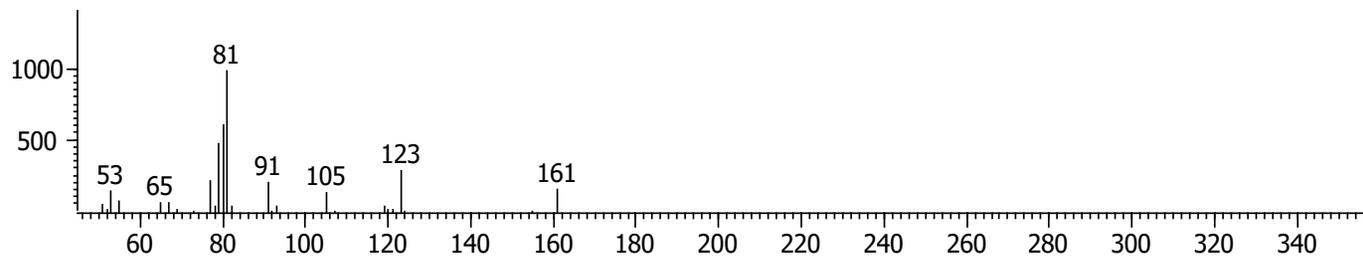
**Figura S27.** Espectro de masas (IE) de  $\alpha$ -felandreno



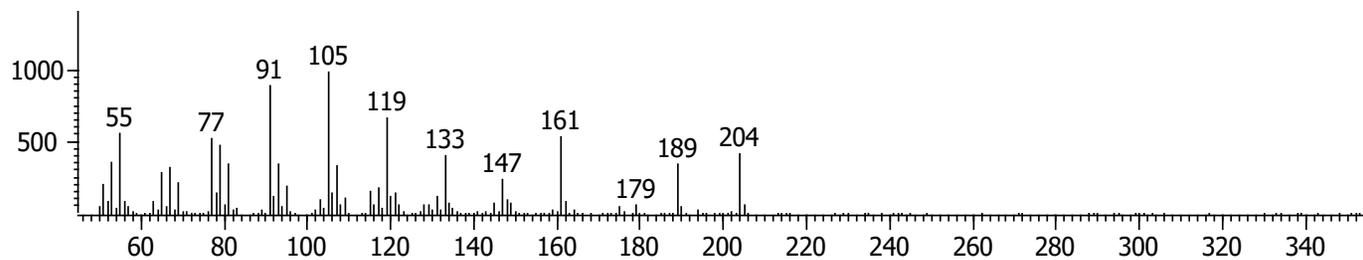
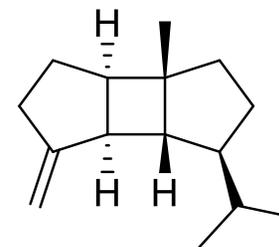
**Figura S28.** Espectro de masas (IE) de *o*-cimeno



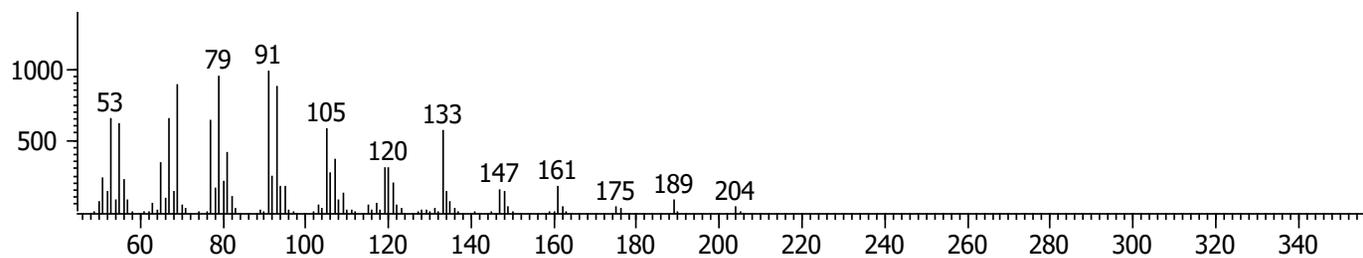
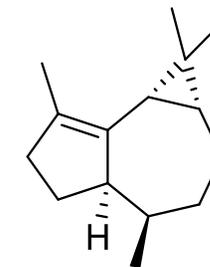
**Figura S29.** Espectro de masas (IE) de fenilacetaldehído



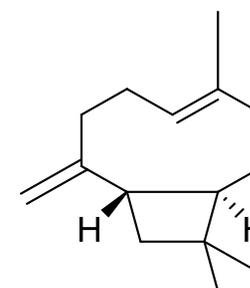
**Figura S30.** Espectro de masas (IE) de  $\beta$ -buorboneno

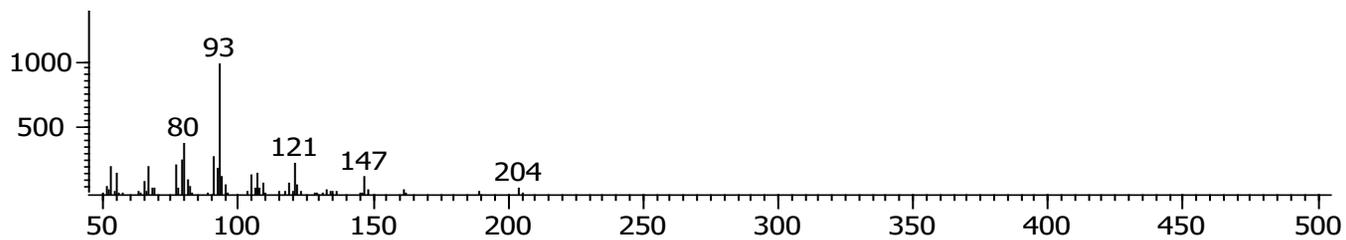


**Figura S31.** Espectro de masas (IE) de  $\alpha$ -gurjuneno

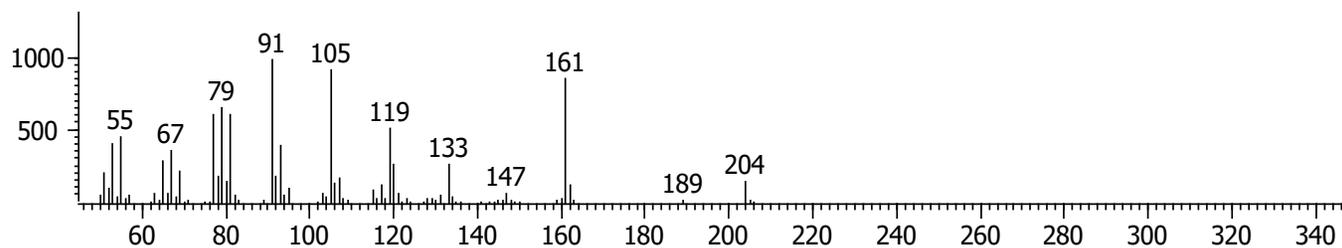
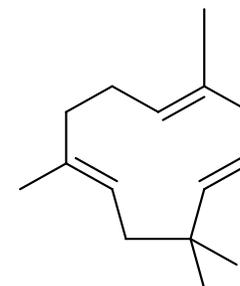


**Figura S32.** Espectro de masas (IE) de cariofileno

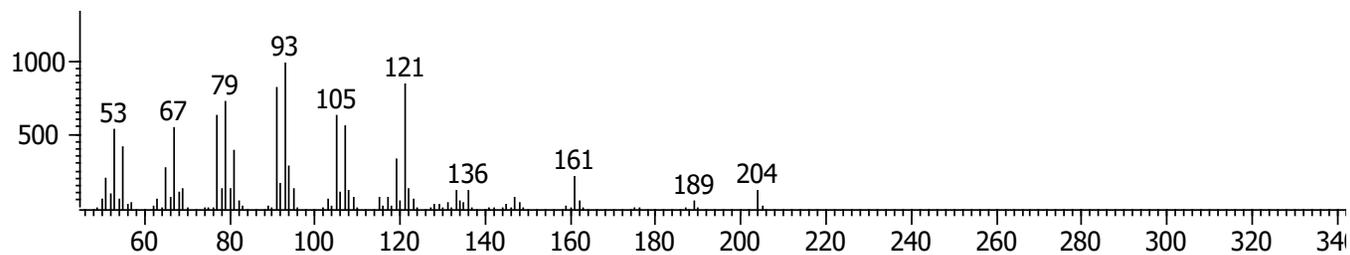
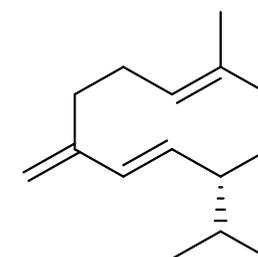




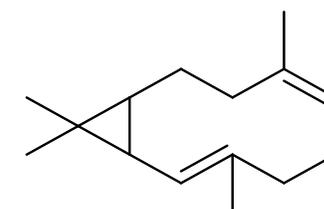
**Figura S33.** Espectro de masas (IE) de  $\alpha$ -humuleno

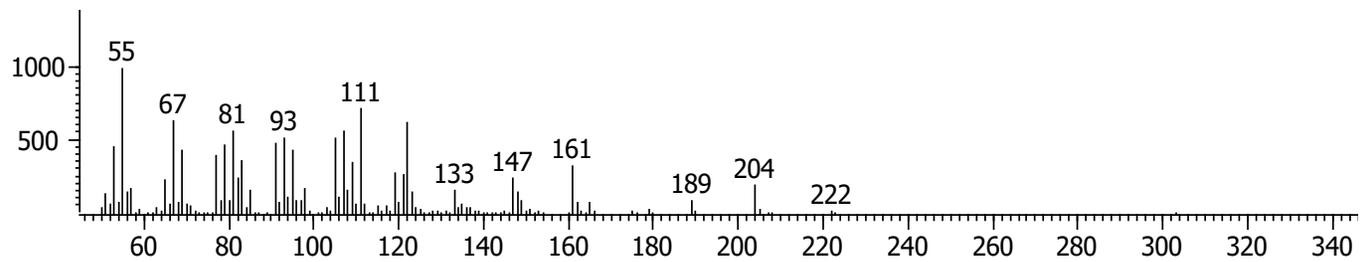


**Figura S34.** Espectro de masas (IE) de germacreno D

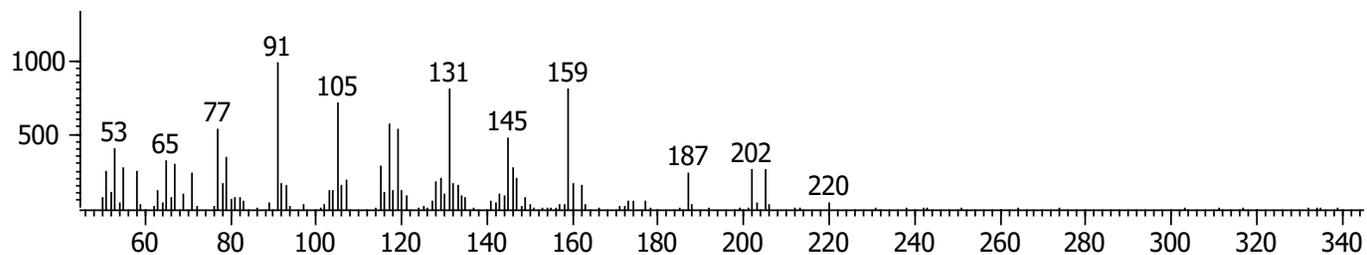
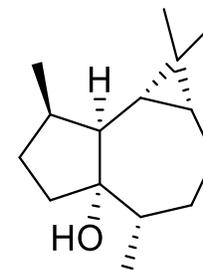


**Figura S35.** Espectro de masas (IE) de bicylogermacreno

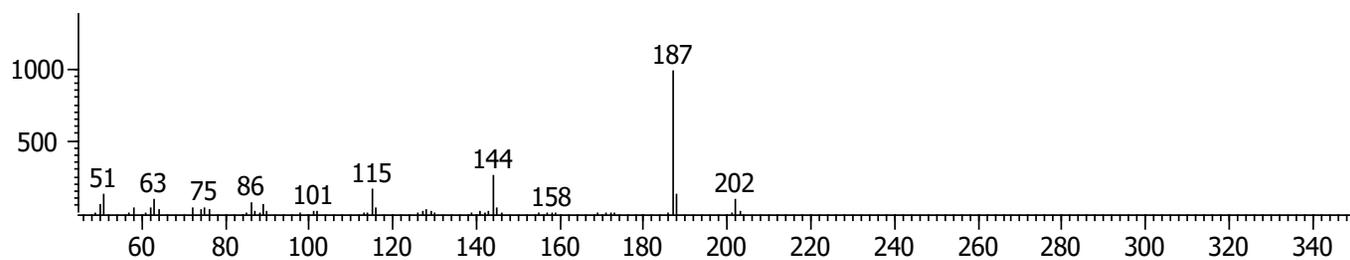
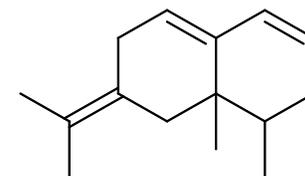




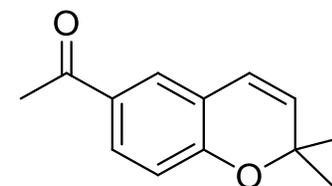
**Figura S36.** Espectro de masas (IE) de palustrol

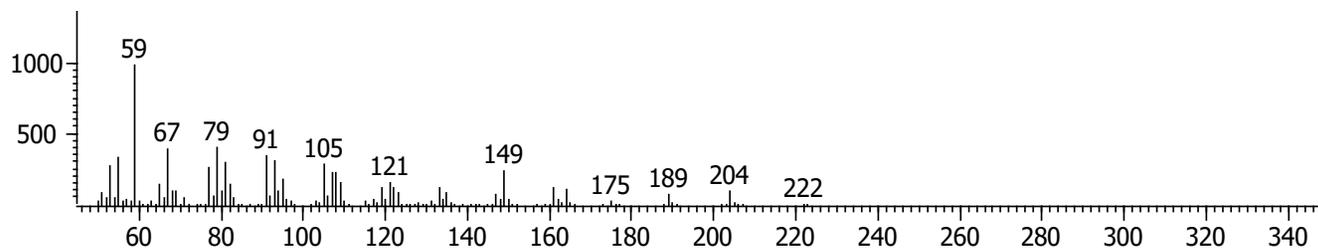


**Figura S37.** Espectro de masas (IE) de  $\beta$ -Vatirenenol

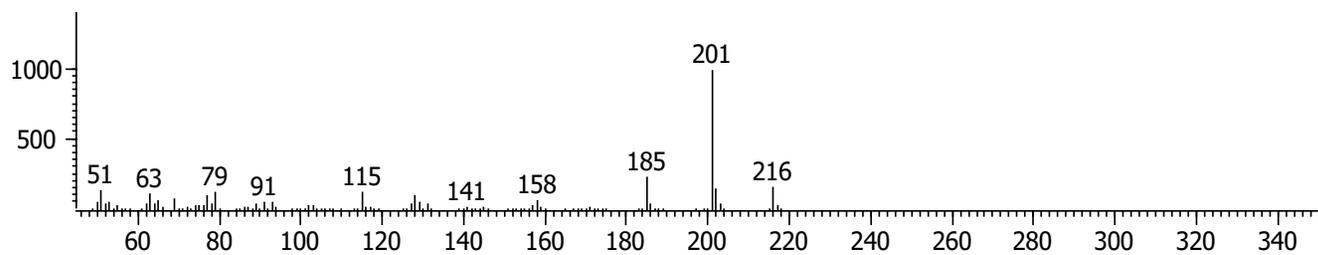
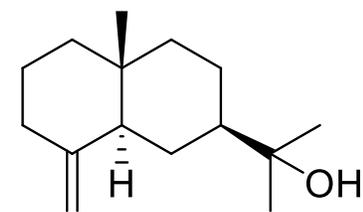


**Figura S38.** Espectro de masas (IE) de desmetoxiencicalina

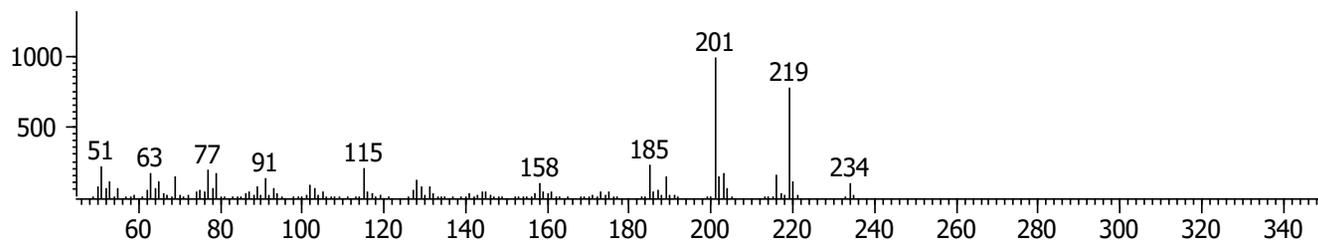
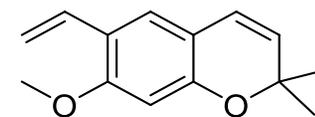




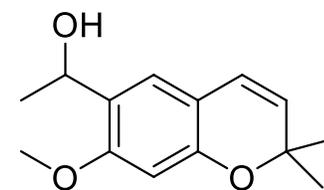
**Figura S39.** Espectro de masas (IE) de  $\beta$ -Eudesmol



**Figura S40.** Espectro de masas (IE) de androencecalinol



**Figura S41.** Espectro de masas (IE) de encecalinol



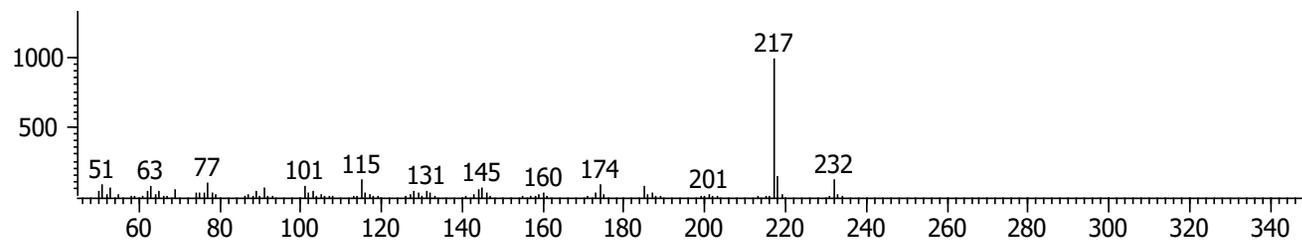


Figura S42. Espectro de masas (IE) de enecalina

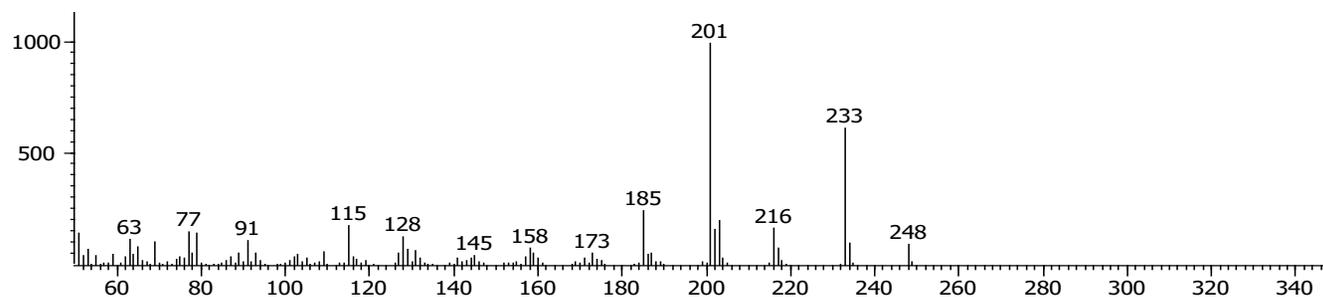
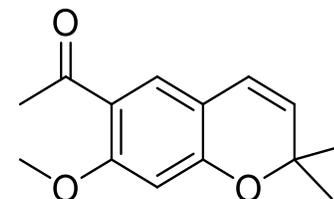
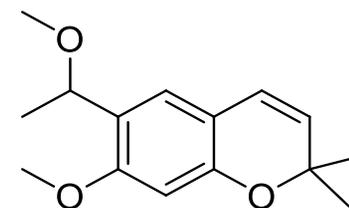


Figura S43. Espectro de masas (IE) de *O*-encecalinol



**Tabla S1.** Análisis de probabilidad DP4+ en los niveles B3LYP/6-31G+(d,p)

Functional		Solvent?	Basis Set			Type of Data
mPW1 PW91		PCM	6-31+G(d,p)			Shielding Tereors
		DP4+	0.00%	12.81%	87.19%	0.00%
Nuclei	sp2?	Experimental	Isomer1	Isomer2	Isomer3	Isomer4
						Isomer 5
C	x	130.4	69.5070923	69.7316697	69.7145858	69.5093215
C	x	129.72	69.9907278	67.7663344	67.6780106	70.0203766
C	x	119.53	70.130653	73.7324863	73.9149758	72.7084909
C	x	157.2	37.0842049	37.8830645	37.8496414	38.615855
C	x	117.46	77.0353376	79.4986693	79.4224174	80.2031455
C	x	130.4	64.1051376	65.2677108	65.38042	66.9008121
H	x	7.87	21.9117498	22.8821785	22.917483	22.8717025
H	x	6.88	23.2140575	24.2200444	24.2142442	24.2030454
H	x	7.83	22.3364076	23.2572508	23.2297142	23.2687309
C	x	169.4	31.9692535	27.8577313	27.8503622	33.2312467
C		74.19	122.330743	131.561729	131.573214	127.566251
C		79.63	124.701268	134.045368	134.008798	130.062004
H		3.87	27.2592215	27.777958	27.7882812	28.4289908
C		19.64	168.605617	176.625463	176.613028	171.374099
H		1.33	28.6131928	30.5410624	30.1111139	30.8275562
H		1.33	28.7964162	30.7559619	30.7478854	29.9130059
H		1.33	28.7666352	30.1124371	30.5356873	30.0340792
C		25.91	164.334853	171.196131	171.178196	175.813428
H		1.5	28.6849513	30.0106834	30.0086358	29.9907038
H		1.5	28.8022303	30.748274	30.0887541	29.839625
H		1.5	29.5600188	30.0869757	30.7556166	30.0272643
C	x	126.7	68.0046923	71.2943816	71.0811979	70.8056399
C	x	141.29	45.2470409	45.8659879	46.4264113	47.5310837
H	x	6.2	23.6667016	24.6587654	24.6582206	24.6703671
C		20.58	165.469138	173.105049	173.047197	172.503961
H		1.93	28.1383858	29.4640191	29.3693742	29.1476989
H		1.93	28.6163279	29.9536969	29.9611853	29.8436225
H		1.93	27.8713782	29.3525806	29.4574903	29.2790598
C		16.08	170.411907	177.342357	177.245339	177.561031
H		2.04	28.4699124	29.6515666	29.8406058	29.514932
H		2.04	26.6897837	28.1005356	28.1713061	28.0077418
H		2.04	28.5862731	29.8783581	29.6678084	29.7990915
C	x	196.4	2.25784926	2.34681583	2.40473487	2.36479599
C		26.31	161.610328	168.688179	168.693388	168.536243
H		2.51	27.5821803	28.7809863	28.7717216	29.5013033
H		2.51	28.2925078	29.4854866	29.4840556	28.7619658
H		2.51	27.5814084	28.7683977	28.7820587	28.7635907
C		71.86	122.70144	121.858416	121.746867	127.685072
H		5.94	24.0993658	26.0579248	26.0495171	25.148092

**Tabla S2.** Análisis de probabilidad DP4+ en los niveles mPW1PW91/6-31G+(d,p).

Functional		Solvent?	BasisSet			Type of Data	
mPW1PW91		PCM	6-31+G(d,p)			Shielding Tensors	
		DP4+	0.00%	12.81%	87.19%	0.00%	-
Nuclei	sp2?	Experimental	Isomer1	Isomer2	Isomer3	Isomer4	Isomer5
C	x	130.4	69.5070923	69.7316697	69.7145858	69.5093215	
C	x	129.72	69.9907278	67.7663344	67.6780106	70.0203766	
C	x	119.53	70.130653	73.7324863	73.9149758	72.7084909	
C	x	157.2	37.0842049	37.8830645	37.8496414	38.615855	
C	x	117.46	77.0353376	79.4986693	79.4224174	80.2031455	
C	x	130.4	64.1051376	65.2677108	65.38042	66.9008121	
H	x	7.87	21.9117498	22.8821785	22.917483	22.8717025	
H	x	6.88	23.2140575	24.2200444	24.2142442	24.2030454	
H	x	7.83	22.3364076	23.2572508	23.2297142	23.2687309	
C	x	169.4	31.9692535	27.8577313	27.8503622	33.2312467	
C		74.19	122.330743	131.561729	131.573214	127.566251	
C		79.63	124.701268	134.045368	134.008798	130.062004	
H		3.87	27.2592215	27.777958	27.7882812	28.4289908	
C		19.64	168.605617	176.625463	176.613028	171.374099	
H		1.33	28.6131928	30.5410624	30.1111139	30.8275562	
H		1.33	28.7964162	30.7559619	30.7478854	29.9130059	
H		1.33	28.7666352	30.1124371	30.5356873	30.0340792	
C		25.91	164.334853	171.196131	171.178196	175.813428	
H		1.5	28.6849513	30.0106834	30.0086358	29.9907038	
H		1.5	28.8022303	30.748274	30.0887541	29.839625	
H		1.5	29.5600188	30.0869757	30.7556166	30.0272643	
C	x	126.7	68.0046923	71.2943816	71.0811979	70.8056399	
C	x	141.29	45.2470409	45.8659879	46.4264113	47.5310837	
H	x	6.2	23.6667016	24.6587654	24.6582206	24.6703671	
C		20.58	165.469138	173.105049	173.047197	172.503961	
H		1.93	28.1383858	29.4640191	29.3693742	29.1476989	
H		1.93	28.6163279	29.9536969	29.9611853	29.8436225	
H		1.93	27.8713782	29.3525806	29.4574903	29.2790598	
C		16.08	170.411907	177.342357	177.245339	177.561031	
H		2.04	28.4699124	29.6515666	29.8406058	29.514932	
H		2.04	26.6897837	28.1005356	28.1713061	28.0077418	
H		2.04	28.5862731	29.8783581	29.6678084	29.7990915	
C	x	196.4	2.25784926	2.34681583	2.40473487	2.36479599	
C		26.31	161.610328	168.688179	168.693388	168.536243	
H		2.51	27.5821803	28.7809863	28.7717216	29.5013033	
H		2.51	28.2925078	29.4854866	29.4840556	28.7619658	
H		2.51	27.5814084	28.7683977	28.7820587	28.7635907	
C		71.86	122.70144	121.858416	121.746867	127.685072	
H		5.94	24.0993658	26.0579248	26.0495171	25.148092	

Tabla S3. Análisis de probabilidad J-DP4.

Isomer N°		1	2	3	4
DP4 (%)	H	0.01	17.46	77.19	5.34
	C	43.37	0.00	48.55	8.08
	H+C	0.01	0.00	38.85	1.14
	J	14.75	35.53	34.76	14.96
	<b>all data</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>99.50</b>	<b>0.49</b>
Type	Exp	1	2	3	4
C	130.4	66.181	66.3406	66.321	66.1887
C	129.72	67.635	65.5374	65.443	67.6678
C	119.53	66.74	69.9712	70.154	69.2036
C	157.2	33.742	67.8203	34.503	35.1444
C	117.46	74.387	76.6666	76.583	77.4463
C	130.4	61.858	62.9704	63.093	64.5633
H	7.87	22.068	23.0464	23.085	23.0389
H	6.88	23.414	24.4149	24.409	24.4113
H	7.83	22.528	23.4614	23.431	23.4679
C	169.4	29.167	24.958	24.971	30.3173
C	74.19	117.71	126.898	126.91	122.732
C	79.63	120.38	129.509	129.47	125.57
H	3.87	27.319	27.8377	27.849	28.4925
C	19.64	164.83	172.61	172.6	167.469
H	1.33	28.692	30.5741	30.186	30.8893
H	1.33	28.824	30.7946	30.787	29.9773
H	1.33	28.806	30.1875	30.569	30.0708
C	25.91	160.59	167.115	167.11	171.88
H	1.5	28.747	30.0788	30.076	30.0318
H	1.5	28.837	30.7979	30.124	29.9209
H	1.5	29.62	30.1216	30.806	30.0561
C	126.7	64.675	67.7771	67.574	67.3488
C	141.29	42.912	43.5022	44.053	45.0885
H	6.2	23.79	24.7786	24.778	24.7956
C	20.58	161.68	169.248	169.2	168.584
H	1.93	28.185	29.5102	29.419	29.1996
H	1.93	28.726	30.0648	30.072	29.9559
H	1.93	27.919	29.3996	29.507	29.3286
C	16.08	166.91	173.672	173.56	173.897
H	2.04	28.537	29.7187	29.917	29.587
H	2.04	26.749	28.1817	28.249	28.0693
H	2.04	28.66	29.9578	29.736	29.8781
C	196.4	-0.0986	-0.1508	-0.0931	-0.1025
C	26.31	158.35	165.375	165.38	165.125
H	2.51	27.657	28.8582	28.849	29.6592
H	2.51	28.444	29.6376	29.637	28.8401
H	2.51	27.657	28.8448	28.86	28.8429
C	71.86	118.77	117.344	117.24	123.577
H	5.94	24.163	26.1366	26.129	25.2156
J	8.60	8.607	8.68375	8.6914	8.60921
J	1.90	1.723	1.64106	1.6408	1.72317
J	7.56	8.080	7.17368	7.1894	8.06477