

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE UN DIFTALATO
COMO POSIBLE CONSTITUYENTE GENUINO DE UNA
FRACCIÓN VASORRELAJANTE DE *Crataegus gracilior*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

YAOTZIN CRUZ CRUZ

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE UN
DIFTALATO COMO POSIBLE
CONSTITUYENTE GENUINO DE UNA
FRACCIÓN VASORRELAJANTE DE *Crataegus gracilior*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

YAOTZIN CRUZ CRUZ

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SINODALES

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

DIRECTOR

Dra. DORA MARINA GUTIÉRREZ AVELLA

SINODAL

M. en C. ELOY RODRÍGUEZ DE LEÓN

SINODAL

M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE

SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Género <i>Crataegus</i>	1
1.1.1. Usos de <i>Crataegus spp</i>	1
1.1.2. Características botánicas de <i>Crataegus gracilior</i>	5
1.1.3. Distribución geográfica	6
1.2. Perfil químico del género <i>Crataegus</i>	7
1.3. Triterpenos aislados del género <i>Crataegus</i>	9
1.4. Actividad farmacológica de algunos triterpenos	11
1.5. Actividad cardiovascular de triterpenos	15
1.6. Ftalatos	15
1.6.1. Ftalatos en organismos como metabolitos secundarios genuinos	15
1.6.2. Actividades farmacológicas de ftalatos	17
2. HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. General	21
3.2. Específicos	21
4. METODOLOGÍA	22
4.1. Materiales	22
4.1.1. Material de estudio	22
4.1.2. Material de laboratorio	22
4.1.3. Equipos que se emplearon para la realización del proyecto	22
4.1.3.1. Equipos para el procesamiento de la fracción objeto de estudio	22
4.1.3.2. Equipos para el análisis de fracciones secundarias y la	

purificación de compuestos	23
4.2. Métodos	23
4.2.1. Fraccionamiento secundario de una fracción metanólica del extracto original	24
4.2.2. Análisis cromatográfico de la fracción mediante CCF	24
4.2.3. Preparación del agente revelador sulfato cérico amoniacal	24
4.2.4. Análisis cromatográfico de la fracción seleccionada mediante HPLC	24
4.2.5. Identificación de los compuestos aislados	25
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
5.1. Fraccionamiento de la fracción metanólica primaria 9 de <i>Crataegus gracilor</i> Phipps	26
5.2. Análisis cromatográfico de la fracción mediante CCF	28
5.3. Análisis cromatográfico de la fracción 109-130 mediante HPLC	28
5.4. Identificación del compuesto aislado (“mavg-CG-4”)	30
5.5. Significado del hallazgo de este diftalato en esta planta medicinal	34
6. CONCLUSIONES	36
7. REFERENCIAS	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Fracciones colectadas, sistemas de elución empleados en la CC-I y pesos obtenidos de las fracciones combinadas	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Crataegus gracilior</i>	6
2	Estructuras químicas de algunos de los compuestos aislados de especies de <i>Crataegus</i>	9
3	Ftalatos encontrados en diversos organismos	17
4	Cromatografía en capa fina	28
5	Cromatograma en HPLC de la fracción 109-130 con fase móvil de CH ₂ Cl ₂	29
6	Cromatograma en HPLC de la fracción 109-130 con fase móvil de CH ₂ Cl ₂ :Hexano (95:5)	29
7	Espectro de RMN de ¹³ C	30
8	Espectro de RMN de ¹³ C modalidad APT	31
9	Espectro de RMN de ¹ H completo	32
10	Espectro de correlación bidimensional ¹ H- ¹³ C; HSQC	33
11	Espectro ¹ H- ¹ H, COSY	33
12	Estructura del di-(2-etilhexil)ftalato (DEHF)	34

RESUMEN

El desarrollo de medicamentos mediante síntesis en laboratorio había eclipsado por décadas la medicina tradicional basada principalmente en el uso de plantas medicinales. Sin embargo, diversos factores desfavorables, como la relativa ineficacia de esos medicamentos y su costo, han imprimido un nuevo impulso al empleo de plantas medicinales. Los padecimientos cardiovasculares (hipertensión arterial, fallo cardíaco, isquemias, etc.) forman parte de las enfermedades crónico-degenerativas en constante y acelerado aumento en el mundo, incluyendo México. Entre las plantas medicinales mexicanas que se usan de manera tradicional para tratar la hipertensión, se encuentran las pertenecientes al género *Crataegus*, las cuales en México se conocen como tejocotes. Se han comprobado científicamente los efectos benéficos de varios de los metabolitos secundarios presentes en otras especies no mexicanas. Hoy en día, se encuentran en Asia, Europa y América del Norte (Canadá y Estados Unidos) extractos estandarizados de *Crataegus* locales con uso clínico para tratar varias de esas enfermedades. El presente proyecto forma parte de otro más amplio enfocado a identificar los metabolitos secundarios de especies mexicanas de *Crataegus* y determinar sus efectos sobre la hipertensión arterial. Durante los estudios químicos de la fracción metanólica vasorrelajante del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus gracilior* recolectada en Querétaro, se obtuvo, entre otros compuestos, un diftalato, el di-(2-etilhexil)ftalato (DEHF) con alto rendimiento, haciendo posible considerarlo como constituyente químico auténtico de esta especie vegetal. Se describe en la presente tesis su aislamiento mediante cromatografía en columna, su identificación mediante resonancia magnética nuclear y la posible repercusión de su presencia en la fracción con mayor actividad vasorrelajante.

1. ANTECEDENTES

1.1. Género *Crataegus*

1.1.1. Usos de *Crataegus spp*

Los productos naturales (plantas, animales y microorganismos) han sido usados como agentes medicinales durante siglos, tanto en su forma no procesada como en forma de extractos (Kuo y col., 2009), y en las últimas décadas, han sido una gran fuente de compuestos nuevos con actividad biológica (Çitoğlu y Acikara, 2012).

El potencial de los productos naturales como fuentes de nuevos medicamentos es alto. Sin embargo, solo una pequeña proporción de ellos (alrededor del 1%), que incluye exclusivamente aquellos originados de organismos vivos, ha sido investigada científicamente. En la mayoría de países europeos, los fitomedicamentos y hierbas han sido integrados a medicinas convencionales, destacándose entre los más importantes, los utilizados para tratar problemas relacionados con afectaciones del corazón y otros componentes del sistema cardiovascular. Entre esos fitomedicamentos, se encuentran los elaborados en base a especies del género *Crataegus* (Edwards y col., 2012).

Medicinas herbales derivadas de extractos de plantas han aumentado su uso en una amplia variedad de enfermedades, dejando los constituyentes y mecanismos de acción desconocidos (Xu y col., 2009). En años pasados, 60% de los medicamentos para el tratamiento de cáncer y 75% de los nuevos medicamentos para infecciones han provenido de fuentes naturales (Wang y col., 2013; Newman y Cragg, 2016).

Muchas investigaciones se han enfocado en la propiedades terapéuticas de plantas con efectos hepatoprotector, antimicrobiano, gastroprotector y antioxidante (Keskin y col., 2012).

Actualmente, con la gran variedad de productos naturales útiles para la salud y que parecen tener una alta eficacia y pocos efectos adversos, hay un

interés renovado en el desarrollo de nuevos medicamentos. Las investigaciones permiten explorar y verificar el potencial efecto de dichos productos para proveer guías para su uso a nivel clínico y descubrir nuevos medicamentos (Wang y col., 2013).

El suplemento de la dieta con fitoquímicos se ha vuelto una estrategia en la prevención de enfermedades. Lamentablemente, pocos protocolos están disponibles para su análisis químico (Calgiani y col., 2013).

En los últimos años, ha habido un aumento de la resistencia a la quimioterapia para tratar el cáncer, haciendo difícil tratar a los pacientes con este padecimiento, siendo una opción el uso de quimioprotección, que de acuerdo a varios estudios epidemiológicos proveen los fitoquímicos adecuados, al reducir la incidencia de distintos tipos de cáncer (Al-Assaf, 2013).

Los frutos, hojas, raíces y flores de *Crataegus spp.* han sido usados en diversas partes del mundo como medicamentos, comida y adorno (Li, 2015). En la medicina tradicional europea, china y de norteamericana, *Crataegus spp.* han sido usadas para el tratamiento de diferentes padecimientos, entre ellos las enfermedades cardiovasculares como fallo cardiaco, angina de pecho, hipertensión, arritmia (Chang y col., 2013), resolución de la estasis sanguínea (Wang y col., 2011) y como agentes antiateroscleróticos (Liu, 2012). También se han usado para problemas digestivos, así como agentes astringentes y analgésicos (López-Corona, 2013), hipolipidémicos en la sangre (Razeai-Golmisheh, 2015), antioxidantes en general, inhibidores de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés: Low Density Lipoprotein) (Chang y col., 2013), para enfermedades de la vesícula biliar, insomnio, agentes antiespasmódicos en casos de asma, disnea (Wang y col., 2013). Dichos productos se han utilizado además como inhibidores moderados de la enzima convertidora de angiotensina (ACE, por sus siglas en inglés: Angiotensin Converting Enzyme) (Yarnell, 2012), por lo que son usados como hipotensivos y diuréticos, sin bloquear receptores β -adrenérgicos. Se ha descrito su uso para desórdenes del sistema nervioso central como la ansiedad y la depresión moderada (Kumar y col., 2012).

Los estudios realizados con animales prueban que las especies de *Crataegus* tienen un amplio rango de propiedades farmacológicas. Los estudios indican que los compuestos encontrados en *Crataegus spp.* tienen la facultad de aumentar las contracciones del corazón, el flujo sanguíneo, la relajación del endotelio y reducen el daño después de eventos isquémicos (McCune, 2013). A continuación, se describen algunas de esas propiedades.

C. mexicana Moc, *C. gracilior* Phipps, *C. pest* y *C. aronia* son usadas como hipoglucemiantes en estadios tempranos de Diabetes Mellitus II (Kumar y col., 2012). Por su parte, el extracto de *C. aronia* var. *dentata* Browicz logró incrementar la regeneración hepática en grupos experimentales (Keskin y col., 2012).

En otros estudios, se han reportado además de los efectos anteriores, eliminación de radicales libres, actividad antimicrobiana contra *Micrococcus flavus*, *Bacillus subtilis*, *Lysteria monocytogenes* y *Candida albicans* (Wang y col., 2011; Kumar y col., 2012), aumento de la motilidad del espermatozoides, radioprotección, quimiopreención en el surgimiento de tumores (Kumar y col., 2012), así como aumento de la concentración de lipoproteínas de alta densidad y disminución simultánea de la concentración de triglicéridos y protección de las células por regulación de expresión de genes asociados a la apoptosis (Liu, 2012).

El efecto neuroprotector fue observado cuando se usó el extracto metanólico de *C. pinnatifida* en células neuronales PC12 (Chang y col., 2013).

En estudios con ratas y ratones, la fracción de *flavonoides* de *C. pinnatifida* mostró efecto inhibitorio de la absorción de glucosa y triglicéridos (Wang y col., 2011). Los frutos de *C. oxyacantha* inhiben la biosíntesis de tromboxano A₂ (Ikeda y col., 1999). Por su parte, *C. pinnatifida* muestra actividad inmunoestimulante, en base a ensayos en fagocitosis de macrófagos, citotoxicidad de NK (natural killer) y producción en médula de linfocitos (Kumar y col., 2012). En modelos de rata, los extractos de *C. monogyna* protegen de colitis inducida por ácido acético, de manera igual que las estatinas (Malekinejad y col., 2013).

Por las propiedades que poseen los extractos de estas plantas, algunas aparecen dentro de las farmacopeas para poder ser comercializadas de forma estandarizada, como *C. pinnatifida* Bge y *C. pinnatifida* Bge var. Major, las cuales se encuentran en la farmacopea china (Li, 2015), *C. oxyacantha*, *C. monogyna* y *C. leavigata*, en las farmacopeas de Alemania, Reino Unido, Francia y Suiza (Kumar y col., 2012, Liu, 2012). En la farmacopea de los Estados Unidos (USP: US Pharmacopeia), se describen los métodos de identificación y cuantificación de compuestos presentes en *Crataegus* mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y en capa fina (CCF) (Edwards y col., 2012). En Estados Unidos y Europa, se usan los extractos estandarizados de *Crataegus spp.*, como terapia complementaria para fallas cardíacas I y II de acuerdo a la asociación cardíaca de Nueva York (NYHA: New York Heart Association) (Liu, 2012).

En estudios farmacológicos y toxicológicos, se ha reportado que el consumo a largo plazo de los extractos de *C. pinnatifida* Bge. tiene efectos benéficos, con efectos secundarios mínimos (Song y col., 2011), aunque en un estudio a nivel clínico efectuado en 2008, los efectos benéficos del extracto estandarizado de *Crataegus spp.* (WS1442) no fueron diferentes de manera significativa con los obtenidos mediante el tratamiento tradicional en caso de muerte cardíaca, infarto no mortal a miocardio y hospitalización debida a falla cardíaca progresiva en pacientes con falla cardiaca grave (Holubarsch y col., 2008).

Se ha determinado que los extractos de las especies mexicanas *Crataegus spp.* y *C. gracilior* Phipps tienen la misma eficacia en sus efectos en aorta aislada de rata que los extractos estandarizados de *C. monogyna* y *C. oxyacantha* con contenido mayor a 2% de hiperósido (Hernández-Pérez y col., 2014).

1.1.2. Características botánicas de *Crataegus gracilior*

Sinonimias: *Mespilus pubescens*, *C. pubescens*. Este último nombre ya no se puede usar para esta planta, ya que ha sido atribuido posteriormente a otra planta del mismo género. Los nombres comunes registrados en la zona de colecta son tejocote y tejocote sin espinas. *C. gracilior* es un árbol (o a veces arbusto) hasta de 10 m de alto, pero por lo general de talla mucho menor, caducifolio, provisto de espinas rectas, delgadas pero fuertes, hasta de 2.5 cm de largo, en ocasiones parcial o totalmente desprovisto de las mismas; ramillas tiernas con frecuencia café-rojizas o verdosas, vilosas, las más maduras grisáceas y glabrescentes; estípulas lanceoladas, hasta de 1 cm de largo por 0.5 a 2 mm de ancho, otras veces oblanceoladas o falcadas, algo más cortas y anchas, pronto deciduas, con glándulas cortamente estipitadas en el margen, peciolo de 5 a 10(15) mm de largo, canaliculados en el haz, láminas foliares amplia o estrechamente elípticas a lanceoladas, romboides, oblanceoladas u obovadas, de (2.5)4 a 7.5(10) cm de largo por (1.5)2 a 4(4.5) cm de ancho, ápice agudo o a veces redondeado, base por lo general cuneada, margen serrado hacia la parte superior con dientes glandulíferos y entero hacia el medio o tercio inferior, vena media hundida en el haz, prominente en el envés, con 6 o 7 pares de las laterales evidentes, de textura membranácea, de color más oscuro en el haz, prácticamente lampiñas en ambas caras en la madurez, salvo las nervaduras principales vilosas, sobre todo en la juventud; inflorescencias corimbiformes, de 5 a 12 flores, brácteas con frecuencia presentes, semejantes a las estípulas, caedizas, pedicelos blanco-vilosos; flores hasta de 1.2 cm de diámetro; hipantio algo blanco-viloso por fuera, segmentos del cáliz estrechamente triangulares o lanceolados, de (3)4 a 6 mm de largo, con el ápice agudo o romo, a veces denticulado, y el margen serrado-glanduloso y/o provisto de glándulas estipitadas, a veces entero, por lo común glabros por fuera, pubescentes por dentro; pétalos blancos, suborbiculares, cortamente unguiculados, de 4 a 7(8) mm de largo y de ancho; estambres alrededor de 20, dispuestos en 2 verticilos de longitud algo desigual, anteras oblongas, de 0.8 a

1.2(1.4) mm de largo; estilos 2 o 3(4); fruto amarillo claro, más o menos globoso o con frecuencia tendiendo a oblato, de 1.5 a 2.5 cm de diámetro, en ocasiones ligeramente pubescente, núculas 2 a 4. (Rzedowski y Calderon-de-Rzedowski, 2005) (Figura 1).



Figura 1. *Crataegus gracilior*, a) frutos, b) hojas y c) flores (Akulova, 2014)

1.1.3. Distribución geográfica

Las plantas de *Crataegus* son nativas de las zonas templadas del norte de América, Asia oriental y central y Europa, siendo las menos conocidas las de norteamérica (Edwads y col., 2012), mayormente entre las longitudes 30° y 50°N (Kumar y col., 2012).

En México, hay 15 especies, 13 de las cuales se ubican en el norte, 1 en el centro y 2 en el sur; 10 de éstas son endémicas y se encuentran en 20 de los 32 estados, siendo más abundantes en las Sierras Madre Oriental y Occidental y del Sur. Las más utilizadas como alimento y medicamento son *C. mexicana* DC. y *C. gracilior* Phipps. En Querétaro, se encuentra esta primera de manera silvestre, además de ser cultivada. *C. gracilior* Phipps por su parte ha sido recolectada en el Noroeste y este de México: Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro e Hidalgo (López-Corona, 2013).

1.2. Perfil químico del género *Crataegus*

Los compuestos más ampliamente reportados de *Crataegus spp.* son flavonoides, ácidos triterpénicos y ácidos fenilcarboxílicos (Wang y col., 2013) (Figura 2).

Los frutos de *Crataegus spp.* están incrementando su popularidad como alimentos funcionales, teniendo como mayor grupo de compuestos con actividad biológica los compuestos fenólicos, que no han sido caracterizados completamente (Liu y col., 2010).

El género *Crataegus* contiene varios grupos de compuestos fenólicos: procianidinas, flavonoides, flavonoles, C-glicosil flavonas, ácidos fenólicos, antocianidinas y lignanos; aparte están los ácidos triterpénicos (Liu, 2012).

Las flores, frutos y hojas de *Crataegus* contienen complejos tipo bioflavonoides que parecen ser los responsables de las principales actividades farmacológicas de esas plantas en el corazón (Kumar y col., 2012).

En *C. pinnatifida*, se han encontrado polifenoles, flavonoides, ácidos orgánicos, triterpenoides, aminas, aminoácidos, fenilpropanoides, sesquiterpenos, monoterpenos, sesquilignanos y sus glicósidos (Wang, 2015) en una proporción diferente en cada uno de los extractos metanólico, etanólico al 95% y acuoso, con mayor actividad en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS: por sus siglas en inglés: Reactive Oxygen Species), mientras que

el metanólico y etanólico muestran una mayor actividad neuroprotectora en intoxicación inducida con H₂O₂ en la línea celular PC12 (Chang y col., 2013).

Algunos compuestos aislados de *C. pinnatifida* mostraron propiedades antitrombóticas *in vitro*, especialmente significativas para (6S, 7Z, 9R)-roseósido, eriodictiol y 2''-O-ramnosil vitexina, así como actividad antiplaquetaria, principalmente del (6S, 7Z, 9R)-roseósido (Li y col., 2015).

En los extractos de *Crataegus spp.*, se han identificado ácido ursólico (AU), hiperósido, isoquercetina, epicatequina, ácido clorogénico, quercetina, rutina y ácido protocatéquico (Malikinejad y col., 2013).

Más de 20 compuestos activos han sido aislados e identificados en el extracto de *C. oxyacantha*, que es rico en triterpenoides (Estrada y col., 2011).

Del extracto metanólico de *C. cuneata*, se aisló cuneatol, un triterpeno con esqueleto ursano (Ikeda y col., 1999).

En *C. gracilior* Phipps, se han encontrado varios compuestos fenólicos en los extractos etanólico y acuosos de las hojas como la rutina, (+)-catequina, quercetina y kaempferol, además de otros que no pudieron ser identificados por la falta de estándar, pero la hidrólisis ácida demuestra su existencia en forma glicosidada. En el fruto, se identificó ácido clorogénico, de los extractos no hidrolizados ácido clorogénico y rutina, de la decocción del fruto ácido clorogénico, así como de su maceración. Del extracto metanólico hidrolizado en medio ácido, se identificaron (+)-catequina, quercetina y kaempferol. Del extracto metanólico de esta especie se han caracterizado también los ácidos ursólico y corosólico (Hernández-Pérez y col., 2014).

Aunque muchos compuestos han sido aislados de *C. pinnatifida* y sus efectos investigados, aún falta conocer mejor algunos aspectos como la farmacocinética y los mecanismos de acción involucrados en sus efectos (Wu y col., 2014).

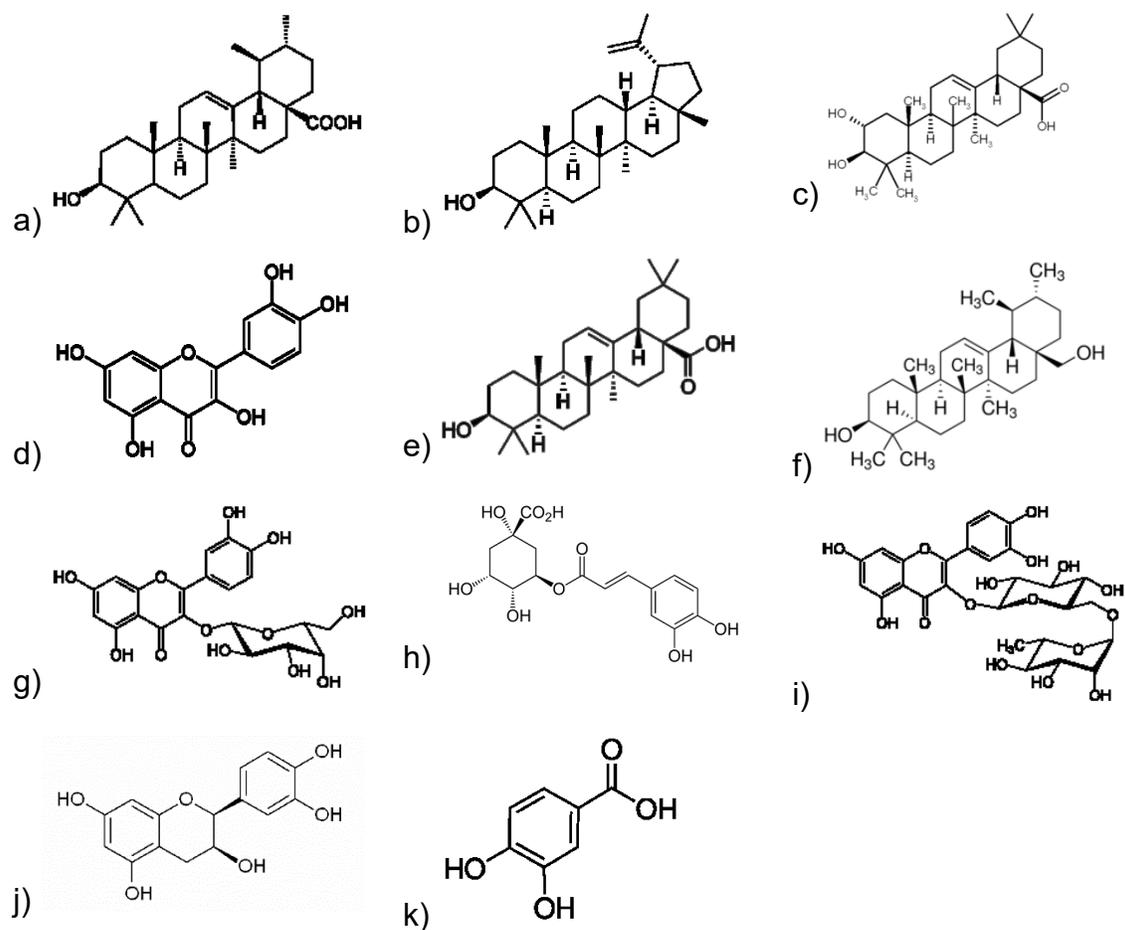


Figura 2. Estructuras químicas de algunos de los compuestos aislados de especies de *Crataegus*: a) ácido ursólico, b) lupeol, c) ácido maslínico, d) quercetina, e) ácido oleanólico (AO), f) uvaol, g) hiperósido, h) ácido clorogénico, i) rutina, j) epicatequina y k) ácido protocatéquico.

1.3. Triterpenos aislados del género *Crataegus*

Los terpenoides forman uno de los grupos de metabolitos secundarios más abundantes en la naturaleza. Esos compuestos son originados de unidades isoprenoides (C_5), unidas de cabeza a cola y, dependiendo del número de unidades que los conformen, se clasifican en monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) y politerpenos. Se han caracterizado más de 30,000

triterpenos, siendo los más extendidos el ácido oleánico (AO) y su isómero, el ácido ursólico (AU), en su forma libre y glicosidada (Çitoğlu y Acikara, 2012).

Los triterpenos representan un gran grupo de metabolitos secundarios presentes en muchos organismos que actúan como toxinas, atrayentes y repelentes. Su presencia en plantas es relevante, especialmente desde el punto de vista funcional y evolutivo. En este grupo, es más común encontrar triterpenos de esqueleto tipo oleanano, ursano, lupano y betulínico (Calgiani y col., 2013).

La determinación de triterpenoides en extractos de plantas es una tarea difícil, debido a los compuestos presentes con polaridades y estructuras similares, ausencia de cromóforos en su estructura y la limitada elección de solventes (Martelanc y col., 2009). Para 2011, se habían extraído más de 170 compuestos diferentes del género *Crataegus* (Song y col., 2011). Una de las desventajas del uso de triterpenos es su toxicidad asociada a sus efectos hemolíticos y citotóxicos (Griffiths y col., 2000).

De la cera de las hojas de *Crataegus spp.*, se han encontrado hasta 50% de su peso en triterpenoides pentacíclicos, con una alta proporción de amirinas y sus ésteres, predominando los derivados de ursano sobre los de oleanano (Griffiths y col., 2000). La fracción de triterpenos de *Crataegus spp.* ha exhibido actividad antiinflamatoria en varios modelos (Wang y col., 2013).

La mayoría de los triterpenos aislados de *Crataegus spp.* son los ácidos ursólico y oleanólico (Gao y col., 2010). De *C. oxyacantha*, se ha aislado ácido maslínico (Wu y col., 2014) y del extracto hexánico de *C. monogyna* Jacq, se ha encontrado cicloartenol (Ahumada y col., 1997).

De los extractos etanólicos de *Crataegus spp.*, se han aislado ácido ursólico, ácido oleanólico, lupeol (Razaei-Golmisheh y col., 2015), uvaol y ácido 3-oxo-ursólico (Kumar y col., 2012) (Figura 2).

De *C. pinnatifida*, se han aislado ácido 2 α ,3 β ,19 α -trihidroxiursólico, cureataol, uvaol, ácido crataególico, 24-metilen-24-dihidrooleanoesterol, ácido 18,19-seco-2 α ,13 β -dihidroxi-19-oxo-urs-11,13(18)-dien-28-oico, ácido 2 α ,3 β -dihidroxi-olean-12-en-28-oico, ácido 3 β ,23-dihidroxi-olean-12-en-28-oico, ácido 2 α ,3 β ,23-trihidroxi-olean-12-en-28-oico, 2 α ,3 β ,19 α -dihidroxi-olean-12-en-28-oico,

3 β ,19 α -dihidroxi-olean-12-en-28-oico, 3 β ,19 α ,2-trihidroxi-olean-12-en-28-oico, 2 α ,3 β ,19 α ,23-tetrahidroxi-olean-12-en-28-oico, ácido 2 α ,3 β -dihidroxi-urs-12-en-28-oico, ácido 2 α ,3 β ,6 β -trihidroxi-urs-12-en-28-oico, ácido 3 β ,6 β ,18 β -trihidroxi-olean-12-en-28-oico, 3 β ,6 β ,18 β ,23-tetrahidroxi-olean-12-en-28-oico, 2 α ,3 β ,6 β ,18 β -tetradroxi-olean-12-en-28-oico y 2 α ,3 β ,6 β ,18 β ,23-pentahidroxi-olean-12-en-28-oico, todos los cuales mostraron actividad antitumoral (Qiao y col., 2015).

1.4. Actividad farmacológica de algunos triterpenos

Numerosos datos experimentales han mostrado que los triterpenoides pentacíclicos poseen actividad antitumoral, antiinflamatoria, hepatoprotectora, anti-VIH (Xu y col., 2013), antiviral, gastroprotectora, antimicrobiana, antidiabética y hemolítica (Sun y col., 2006).

La química de los triterpenos tipo oleanano y ursano ha sido activamente explorada en los últimos años, dando como resultado una gran variedad en actividades biológicas y farmacológicas (Sun y col., 2006).

El ácido ursólico se encuentra en una gran variedad de fuentes, en forma libre (como aglicona) y en forma de saponinas. Este triterpeno exhibe una gran cantidad de propiedades farmacológicas. Se ha descrito que actúa como antiinflamatorio, anticarcinogénico, antiulcerativo, antihiperlipidémico, antihiper glucémico, hepatoprotector, neuroprotector, antioxidante, anti-VIH, antiobesogénico, antidiabético (Li, 2012) y disminuye la absorción del colesterol en el intestino (Razaei-Golmisheh y col., 2015). Tiene efecto inhibidor de la proliferación tumoral inducida en piel por el 13-acetato de tetradecanoil forbol; inhibe la peroxidación de lípidos inducida por rayos UVB, así como el estrés oxidativo y el daño al ADN (Ramachandran, 2008). Además, ha mostrado una inhibición selectiva de ciclooxigenasa-2 (COX-2; por sus siglas en inglés: Cyclooxygenase-2) (Song y col., 2011). También ha mostrado que mejora la función de las células β -pancreáticas, disminuye la intolerancia a la glucosa,

inhibe la producción de glucosa hepática en modelos de ratones y el desarrollo de nefropatía diabética (Li, 2012).

El cicloartenol, el acetato de β -amirina, el AU y el β -sitosterol exhiben actividad antiinflamatoria (Ahumada y col., 1997, Sáenz y col., 1997).

Las investigaciones han puesto interés en los mecanismos de acción de los ácidos maslínico, ursólico y oleánico, pues estos poseen actividad citotóxica contra 4 líneas celulares humanas (Xu y col., 2013).

Los ácidos ursólico y betulínico, así como la luteolina y el cinarósido mostraron ser reguladores positivos de sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS, por sus siglas en inglés: endotelial Nitric Oxide Synthase) (Li, 2012). Por su parte, los ácidos ursólico y oleánico suprimen la actividad de aldosa reductasa, aumentando la actividad de glicoxilasa I, que disminuye la formación de la ACE, mejorando por este efecto las funciones renales (Xu y col., 2013). Se ha comprobado por otra parte que los AO y AU poseen actividad contra linfoma, con mayor actividad para el segundo. Con la preparación de derivados semisintéticos, se ha podido ir estableciendo la relación entre la estructura y cada uno de los efectos que poseen (Sun y col., 2006).

El ácido maslínico es un triterpeno pentacíclico encontrado en varias fuentes naturales, con una amplia variedad de efectos biológicos, con una ausencia de efectos secundarios en modelos de ratón, que lo llevan a ser un potencial agente terapéutico y nutraceútico (Lózano-Mena y col., 2014). Ese ácido exhibe efecto hipoglicémico en ratas, convirtiéndolo en un potencial agente terapéutico para la diabetes mellitus tipo II (Xu y col., 2013) e inhibe de manera moderada la glucógeno fosforilasa (GP). Esta acción es mayor en derivados del ácido maslínico. También actúa como inhibidor de VIH-proteasa y el desarrollo de osteoporosis. De manera adicional, exhibe actividad citotóxica en la línea celular P-38 (Wu y col., 2014), tiene efecto cardioprotector en isquemia in vivo, disminuye la síntesis y acumulación de lípidos en las células y aumenta la producción de factor de necrosis tumoral α (TNF α , por sus siglas en inglés: Tumor Necrosis Factor), la cual inhibe el crecimiento tumoral y la invasión pancreática (Wang, 2015).

El efecto antiproliferativo del ácido maslínico ha sido estudiado en diversas líneas celulares: adenocarcinoma colorrectal humano (HT-29, CaCo-2), carcinoma hepatocelular humano (HepG2), adenocarcinoma humano (MCF-7), carcinoma cisticoadenóide glandular humano (ACC-2, ACC-M), adenocarcinoma de vesícula biliar, sarcoma sinovial humano y leiomiocarcinoma humano. Los efectos anticancerígenos del ácido maslínico también se presentan in vivo, lo que lo convierte en un potencial agente quimioterapéutico, ya sea sólo o combinado con otros medicamentos.

El ácido maslínico restaura los valores de marcadores hepáticos: lactato deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa; es cardioprotector en episodios de infarto, neuroprotector en toxicidad inducida por glutamato, antimicrobiano contra *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* y anti parasitario contra *Eimeria tenella* y *Plasmodium spp.*, impide la entrada celular de *Toxoplasma gondii* y actúa como estimulante del crecimiento en *Oncorhynchus mykiss*, por aumento de la producción de proteínas.

Las pocas cantidades de ácido maslínico en sus fuentes naturales, aunado a su pobre absorción en su farmacocinética, hacen que su biodisponibilidad no haya sido suficiente para alcanzar el órgano blanco y beneficiarse de sus efectos (Lózano-Mena y col., 2014).

El ácido betulínico es un triterpeno pentacíclico, ampliamente distribuido en plantas, conocido por sus actividades antivirales, antitumorales, antiinflamatorias, su efecto protector sobre sistema cardiovascular (Li, 2012) y su habilidad para disminuir la absorción de colesterol en intestino (Razaei-Golmisheh y col., 2015). En modelos de ratón, el ácido betulínico posee regulación positiva de la eNOS y negativa de NADPH, ambas relacionadas con tamaño de infarto (Li, 2012).

La betulina, de la misma manera que el ácido betulínico, tiene actividad antitumoral, pero más débil que éste (Kuo y col., 2009).

El ácido oleanólico es un triterpeno muy bien conocido en numerosas plantas y con variadas propiedades biológicas tales como antiinflamatorio,

tripanocida, anti-VIH y citotóxico (Kuo y col., 2009). El ácido oleanólico mejora la tolerancia a la glucosa y posee potencial antiaterogénico a través de la modulación del metabolismo de lípidos y glucosa (Xu y col., 2013).

Los ácidos betulínico y ursólico son agonistas a TGR5, que los convierte en potenciales agentes en el tratamiento de enfermedades metabólicas (Li, 2012).

El ácido pomólico, triterpeno tipo ursano, es el principal responsable de la hipotensión en modelo de ratas, de la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por adenosina difosfato y epinefrina y está asociado también con efectos antitumorales, anti-VIH y antiinflamatorias (Estrada y col., 2011).

Los ácidos ursólico, oleánico y maslínico poseen efecto inhibitorio en el crecimiento de líneas celulares cancerosas colorrectales, prostáticas y de vesícula biliar *in vitro*, mediante la supresión de la expresión de mRNA de factores angiogénicos, la disminución de la producción de NO y ROS, así como la migración e invasión de líneas celulares Hep3B, Huh7 y HA22T (Li y col., 2011).

El lupeol es un compuesto aislado de algunas plantas que posee varias propiedades farmacológicas: antiinflamatoria, cardioprotectora, citoprotectora, antimutagénica, antiartrítica y antioxidante (Razaei-Golmisheh y col., 2015).

Se ha encontrado que el ácido corosólico mejora la captura de glucosa para su fosforilación en receptores de insulina en células musculares (Lee y Thuong, 2010), además de inhibir la proteína cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés: Protein Kinase C) y posee citotoxicidad (Sun, 2006), como en la línea celular HeLa de adenocarcinoma de cérvix mediante la inducción de ROS (Xu y col. 2009) y HepG2 (Al-Assaf, 2013).

A la glicirrizina, se atribuye el efecto nefroprotector de los extractos de *Glycyrrhiza spp.* y en pacientes con hemodiálisis, ha sido usado para tratar la hiperkalemia, sin alterar la presión sanguínea (Yarnell, 2012).

Los isómeros 18 α y 18 β del ácido glicirricético son inhibidores de mutagenicidad inducida por diversos mutágenos y también poseen actividades

antiinflamatorias, antivirales, hepatoprotectoras e inmunomoduladora (Kuo y col., 2009).

Muchos de los triterpenoides tipo ursano poseen actividad citotóxica inducida por TPA en distintas líneas celulares humanas (Lee y Thuong, 2010), estimulan la expresión de COX-2 y de sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS, por sus siglas en inglés: inducible Nitric Oxide Synthase), esta última promoviendo la generación de NO (Kuo y col., 2009).

1.5. Actividad cardiovascular de triterpenos

Como los triterpenos poseen una amplia gama de propiedades farmacológicas, si nos enfocados hacia las relacionadas con el sistema cardiovascular, encontramos compuestos como el ácido ursólico que en modelos de ratas con hipertensión (HT), previene el desarrollo de HT severa, mejora la producción de mRNA de eNOS y proteínas de células endoteliales que a su vez mejorara su función (Li, 2012).

En los extractos de *Olea europea*, se han encontrado AO y AU, los cuales fueron usados en ratones con hipertensión como tratamiento no tóxico y barato, que evitó el desarrollo de hipertensión severa y aterosclerosis (Somova y col., 2003).

Triterpenos de *Ganoderma lucidum* han inhibido ACE, mostrando efecto nefroprotector en modelos animales y a una dosis de 1440 mg/día y disminuyendo la presión sanguínea (Yarnell, 2012).

Los efectos cardioprotectores del ácido maslínico han sido también estudiados en el marco del control de factores de riesgo (Lozano-Mena y col., 2014).

1.6. Ftalatos

1.6.1 Ftalatos en organismos como metabolitos secundarios genuinos

Los ftalatos más conocidos han sido diseñados y sintetizados por el hombre para uso industrial en la manufactura de muchos materiales, con los que convivimos y a los cuales estamos expuestos de manera cotidiana por su empleo en productos de uso común, por lo que son detectados en el ambiente: sedimentos, aguas, suelos, plantas y organismos acuáticos. Hay reportes de producción y degradación de ésteres de ftalatos por diversos organismos (Husein y col., 2014).

Considerados generalmente como contaminantes, se ha comprobado que no todos los ftalatos son procedentes de la actividad humana, ya que se han detectado incluso en lugares totalmente aislados de fuentes contaminantes (Babu y Wu, 2010; Husein y col., 2014).

En estudios realizados con isótopos de ^{14}C y ^{13}C , los cuales fueron administrados a varios organismos, se llegó a establecer que éstos producen ésteres de ftalatos (Chen, 2004; Namikoshi y col. 2006). La función de estos metabolitos en los organismos que los producen no es conocida del todo (Husein y col., 2014). Sin embargo, se ha establecido que sus funciones están relacionadas con la bioenergética y que juegan un papel para mantener la flexibilidad de la membrana celular, cuando son liberados bajo situaciones de no estrés. También se les ha atribuido actividades fitotóxicas (Babu y Wu, 2010).

Dentro de los organismos vivos en las que se han reportado ftalatos, se encuentran principalmente algas, microorganismos y plantas. En estas últimas, los ftalatos han sido descritos en *Arum palaestinum* que produce dibutilftalato (DBF), dioctilftalato y diisobutilftalato, mientras que en *Pongamia pinnata* y en *Hypericum*, se ha aislado el di-(2-metilheptil) ftalato (Husein y col., 2014). De *Phyllanthus muellerianus*, se ha reportado la existencia de di-(2-etiloctil)ftalato y di-(2-etilicosil)ftalato (Saleem y col.,2009), en tanto, de las flores de *Calotropis gigantea*, se ha descrito el di-(2-etilhexil)ftalato (DEHF) (Saeidnia y Abdollahi, 2013) (Figura 3). También en la planta *Hypnea musciformis* se ha encontrado dimetiltereftalato (Saeidnia y Abdollahi, 2013). Finalmente, de Aloe vera Linné, se han descrito diheptilftalato, monooctilftalato y el DEHF (Lee y col., 2000).

En las algas *Bangia atropurpurea*, *Ulva fasciata*, *Ulva pinnatifida*, *Enteromorpha intestinalis*, *Laminaria japonica* y *Porphyra angusta*, se han reportado DEHF y DBF (Chen, 2004; Namikoshi y col., 2006)) y en *Phyllophora nervosa* y *Acanthophora delilei* el dimetiltereftalato (Saeidnia y Abdollahi, 2013). Otros éteres de ftalatos se han caracterizado en algas pardas del género *Sargassum* (Husein y col., 2014) y DBF y mono(2-etilhexil)ftalato (MEHF) en algas y cianobacterias (Babu y Wu, 2010) (Figura 3).

Por otra parte, en el hongo *Streptomyces* spp y en la bacteria *Helicobacter pylori*, se han aislado y caracterizado el dietilftalato (DEF) y el DEHF (Figura 3). Ésteres de difenilos polibrominados se han aislado de la ballena *Mesoplion mirus*.

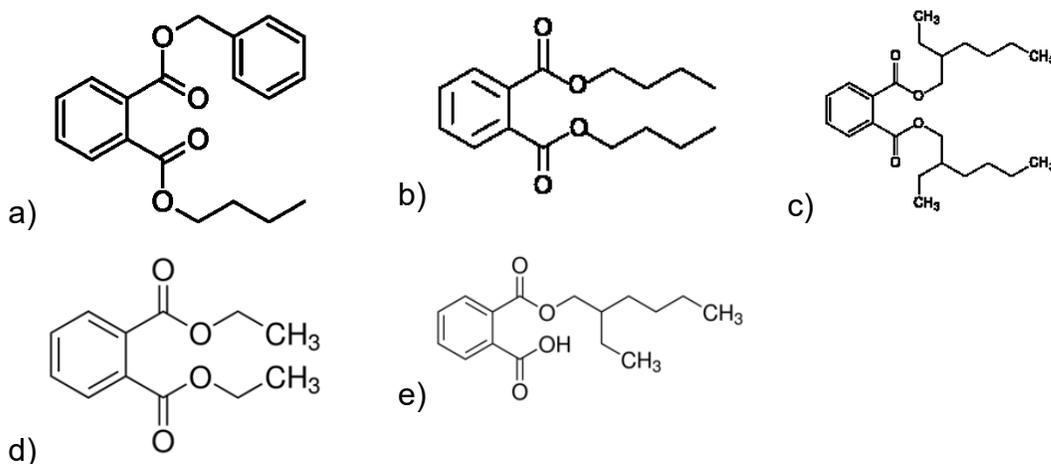


Figura 3. Ftalatos encontrados en diversos organismos: a) BBF, b) DBF, c) DEHF, d) DEF, e) MEHF

1.6.2. Actividades farmacológicas de ftalatos

Los ftalatos y sus derivados son considerados como compuestos tóxicos, que parecen ser menos tóxicos contra microorganismos y organismos acuáticos que pueden degradarlos intracelularmente (Babu y Wu, 2010).

El di (2-etilheptil)ftalato tiene actividad contra el virus que causa el síndrome de mancha blanca (Husein y col., 2014).

Los ésteres de ftalatos tienen actividad antimicrobiana contra diversas especies de *Streptomyces* (Babu y Wu, 2010). El DEHF aislado de *Calotropis gigantea* mostró actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Sarcina luteal*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella shiga*, *Shigella dysenteriae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium spp.* (Saeidnia y Abdollahi, 2013). Por su parte, el DBF demostró tener actividad contra los microorganismos *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* y *Curvularia pallescens* (Roy y col., 2006).

Dentro de otras actividades farmacológicas de los ftalatos, está la de incrementar la proliferación de peroxisomas en ratas, las cuales han sido relacionadas con carcinogénesis, pero no hay evidencia de esta en humanos (Lee y col., 2000). También los ftalatos tienen la reputación de ser disruptores endócrinos con actividad estrogénica. Los ftalatos han demostrado ser antimetabolitos de prolina, siendo esta propiedad el posible mecanismo de acción antimicrobiana (Roy y col., 2006). El DBF *in vitro* ha mostrado que suprime el crecimiento de células cancerígenas, sin afectar la células normales hematopoyéticas (Chu-Tse, y col., 1993).

El DEHF aislado de *Aloe vera* Linné, parece ser antitumoral y antimutagénico, pues logró inhibir 8 líneas tumorales. En experimentos *ex vivo*, este compuesto ha sido eficaz en el tratamiento de leucemia mieloide aguda (Lee y col., 2000) y, junto a su metabolito mono-(2-etilhexil) ftalato, suprime la producción de estradiol en células granulosa ováricas, por regulación negativa de aromatasa (Lovekamp y col., 2001).

El bencil butil ftalato (BBF) y el DBF modifican el factor de crecimiento del fibroblasto-2 que es importante en la modelación del hueso y como disruptor endocrino modifica los filamentos de actina imprescindibles en la adhesión de los osteocitos y amplifican la regulación positiva de factores apoptóticos,

dependiendo del regulador proteico p53 en el ciclo celular; además, BBF incrementa la proliferación de osteoblastos (Agas y Sabbieti, 2012).

2. HIPÓTESIS

El diftalato previamente detectado en la fracción cromatográfica vasorrelajante más eficaz del extracto metanólico de *Crataegus gracilior* tiene la abundancia necesaria para ser aislado, caracterizado y considerado como metabolito secundario genuino de esta planta medicinal.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Aislar e identificar el diftalato detectado de manera preliminar a partir de la fracción metanólica vasorrelajante primaria que tuvo la mayor eficacia en aorta.

3.2. Específicos

- Reducir la complejidad química de la fracción primaria objeto de estudio.
- Obtener en forma pura el diftalato detectado mediante su color característico en cromatografía en capa fina.
- Establecer la estructura química del metabolito aislado mediante espectroscopía RMN.
- Establecer el significado de su hallazgo en esta planta medicinal.

4. METODOLOGÍA

4.1. Materiales

4.1.1. Material de estudio

Una fracción vasorrelajante del extracto metanólico de *Crataegus gracilior*

4.1.2. Material de laboratorio

Se emplearon los siguientes disolventes: hexano, diclorometano (DCM), acetato de etilo (AcOEt), acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH) en grados cromatográfico y reactivo analítico.

Para análisis preliminar de los perfiles químicos y su purificación, se emplearon cromatofolios de gel de sílice (F254) marca Merk.

Se usó material de vidrio común de laboratorio (vasos de precipitado, matraces, probetas, etc.) y una columna de vidrio de 10 cm de diámetro externo y 110 cm de longitud.

4.1.3. Equipos que se emplearon para la realización del proyecto

4.1.3.1. Equipos para el procesamiento de la fracción objeto de estudio

- Dos rotaevaporadores (marca BÜCHI, modelo B-480).
- Bombas de vacío de diferente alcance.
- Balanza granataria marca Ohaus (0.1 g).
- Balanza analítica marca Ohaus (0.0001 g).

4.1.3.2. Equipos para el análisis de fracciones secundarias y la purificación de compuestos

- Lámpara ultravioleta con gabinete modelo UVGL-25, con dos longitudes de onda: 254 y 366 nm
- Columnas analíticas (Zorbax RX SIL, 4.6 x 250 mm con tamaño de poro de 5 μm , Agilent Technologies).
- Un sistema cromatográfico (HPLC) marca Waters integrado por una bomba cuaternaria de entrega de disolventes modelo 600, acoplada a un sistema de detección. Como detector, se dispone de un aparato de absorción en el ultravioleta-visible de arreglo de diodos, modelo 2998 (Waters). El equipo está provisto de un inyector manual Rheodyne 7725i y un degasificador electrónico de cuatro canales (Metachem Technologies Inc.). La adquisición y el procesamiento de datos se llevaron a cabo utilizando el programa Empower3 (Waters).

4.2. Métodos

4.2.1. Fraccionamiento secundario de una fracción metanólica del extracto original

La fracción 9 (23.06 g) resultante del primer fraccionamiento del extracto metanólico original de las hojas de *Crataegus gracilior* Phipps y que sirvió de punto de partida para el presente trabajo se procesó en una columna cromatográfica (CC). Se utilizó una columna de vidrio de 110 cm de alto y 10 cm de diámetro. Para la preparación de la muestra para su aplicación en la columna, se pesaron 34.3 g de gel de sílice (Fluka silica gel, malla de 70-230, tamaño de partícula 60 Å) para adsorber 22 g de muestra y 942 g para empacar la columna. La muestra fue disuelta en una cantidad mínima de MeOH, luego adsorbida en el gel de sílice y la mezcla resultante evaporada hasta sequedad bajo agitación manual con varilla de vidrio en la campana de extracción operada con cierto

vacío. La muestra seca fue aplicada en la parte superior de la columna previamente empacada. Enseguida, fue aplicada otra capa de 1.5 cm de grosor de sulfato de sodio anhidro sobre la muestra con los propósitos de proteger ésta de la humedad y del rompimiento de su nivel horizontal. La columna fue eluida con un gradiente de disolventes que inició con CH₂Cl hasta MeOH. Se colectaron 532 fracciones.

4.2.2. Análisis cromatográfico de las fracciones mediante CCF

Un análisis del perfil de las fracciones colectadas mediante CCF permitió por una parte agruparlas en 15 fracciones y por otra, determinar condiciones de resolución de sus constituyentes. Todos los análisis se llevaron a cabo en cromatofolios (gel de sílice) o cromatoplasacas con dimensiones desde 1 hasta 5 cm de ancho por 8 cm de longitud. Una vez terminada la elución de cada placa cromatográfica, ésta se visualizó con una lámpara ultravioleta y posteriormente mediante rociado con sulfato cérico amoniacal, seguido de calentamiento a 80 °C.

4.2.3. Preparación del agente revelador sulfato cérico amoniacal

A 300 g de hielo, se adicionaron lentamente y con agitación, 12 g de sulfato cérico amoniacal [(NH)₄Ce(SO)₄] y 22.5 mL de ácido sulfúrico concentrado, hasta que se formó una solución homogénea, la cual fue usada directamente para revelar las placas.

4.2.4. Análisis cromatográfico de la fracción seleccionada mediante HPLC

El análisis por medio de la cromatografía de líquidos de alta resolución de la fracción seleccionada se llevó a cabo utilizando una columna ZORBAX RX-SIL (4.6 mm de diámetro interno y 250 mm de longitud) y dos fases móviles

diferentes: a) elución con diclorometano en modo isocrático, un flujo de 1 mL/minuto, un volumen de inyección de 10 μ L, una λ de detección de 254nm; b) una fase móvil de CH₂Cl₂-Hexano (95:5), manteniendo las demás condiciones descritas en el punto a).

4.2.5. Identificación de los compuestos aislados

Para la determinación de las estructuras primarias de los compuestos aislados, se recurrió a la resonancia magnética nuclear en sus diferentes modalidades. El registro de los espectros se realizó mediante un servicio externo efectuado en la Universidad de Guanajuato, donde se utilizó un equipo de 500 MHz. De esta forma, se pudo completar la asignación de todos los núcleos (¹H y ¹³C) y la estructura completa de este compuesto mayoritario.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Fraccionamiento de la fracción metanólica primaria 9 de *Crataegus gracilior* Phipps

La CC realizada en el presente trabajo proporcionó un total de 532 fracciones, las cuales se agruparon finalmente en 15 fracciones principales. El Cuadro 1 resume los sistemas de elución empleados y los rendimientos de las fracciones agrupadas.

Cuadro 1. Fracciones colectadas, sistemas de elución empleados en la CC-I y pesos obtenidos de las fracciones combinadas.

Sistema de elución	Proporción (%)	Fracciones colectadas	Fracciones agrupadas	Peso (mg)		
Hexano	100	1-10	1-47	37.3		
Hexano:DCM	95:5	11-17				
Hexano:DCM	90:10	18-31				
Hexano:DCM	80:20	32-41				
Hexano:DCM	70:30	42-52				
					48-89	3.2
Hexano:DCM	60:40	53-76				
Hexano:DCM	50:50	77-84				
					90-108	25.8
Hexano:DCM	40:60	85-121				
			109-130	131.7		
Hexano:DCM	30:70	122-148				

Cuadro 1. Fracciones colectadas, sistema de elución empleados en la CC-I y pesos obtenidos de las fracciones combinadas (continuación).

			131-151	170.7
Hexano:DCM	10:90	149-164		
			152-189	63.2
DMC	100	165-184		
DCM:AcOEt	90:10	185-228		
			190-220	152.1
			221-231	ND
DCM:AcOEt	80:20	229-244		
			232-250	37.3
DCM:AcOEt	70:30	245-291		
			251-274	359.7
			275-300	819
DCM:AcOEt	60:40	292	301-325	335
			326-376	1553.2
DCM:AcOEt	50:50	355		
DCM:AcOEt	40:60	356-370		
DCM:AcOEt	20:80	371-380		
			377-492	11710.1
AcOEt	100	381-419		
AcOEt:MeOH	90:10	420-482		
AcOEt:MeOH	80:20	483-512		
		513-525	493-532	2710.7
AcOEt:MeOH	50:50			
MeOH	100	526-532		

5.2. Análisis cromatográfico de las fracciones mediante CCF

Las fracciones recolectadas fueron agrupadas de acuerdo a la semejanza de sus perfiles cromatográficos determinados mediante CCF. En base a su baja complejidad, se seleccionó la fracción 109-130 (131.7 mg) con consistencia líquida, la cual mostró únicamente dos manchas al ser visualizada con lámpara ultravioleta (254 nm) y revelada con sulfato cérico amoniacal (Figura 4), para tratar de purificar sus constituyentes individuales.

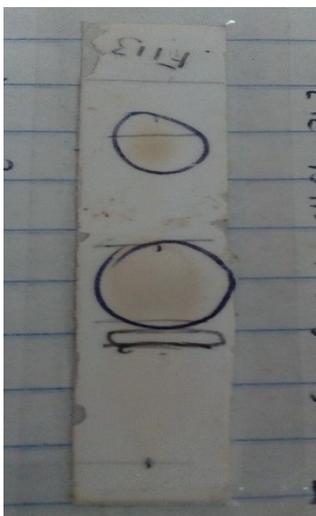


Figura 4. Cromatografía en capa fina de la fracción 109-130.

5.3. Análisis cromatográfico de la fracción 109-130 mediante HPLC

Con la finalidad de confirmar el perfil obtenido en capa fina y eventualmente purificar los componentes, la fracción se sometió a un análisis mediante HPLC en una columna de fase normal (gel de sílice), utilizando fases móviles con diferente composición (Figuras 5 y). Sin embargo, contrariamente a lo observado en la CCF, el cromatograma obtenido mostró un constituyente dominante con una mínima impureza. Por lo tanto, se consideró conveniente registrar los espectros de RMN de la fracción, la cual fue etiquetada con la clave “mavg-CG-4”.

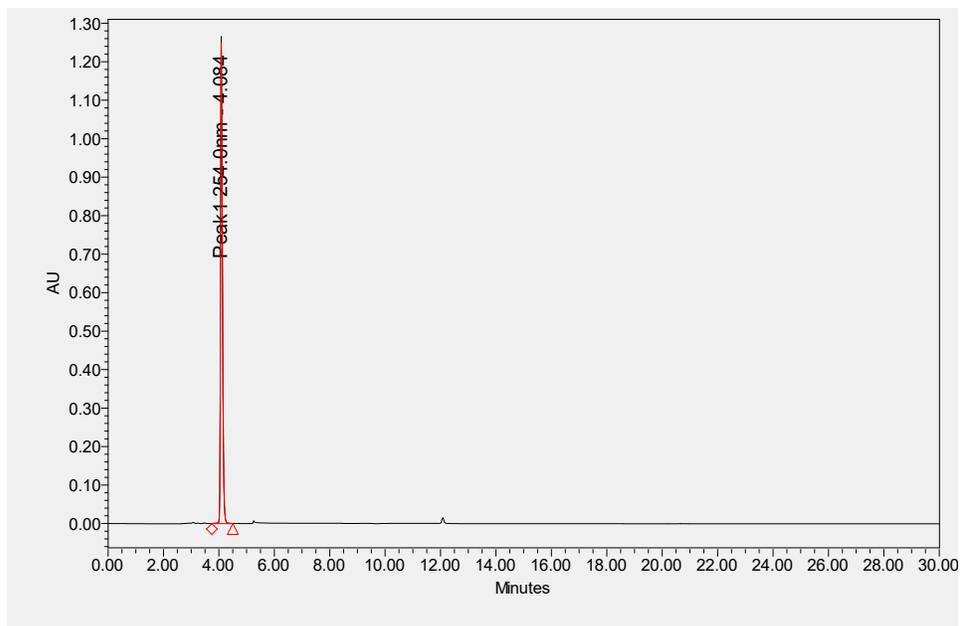


Figura 5. Cromatograma en HPLC de la fracción 109-130 con fase móvil de CH₂Cl₂: flujo: 1 mL/minuto, volumen de inyección: 10 µL, longitud de onda de detección: 254nm.

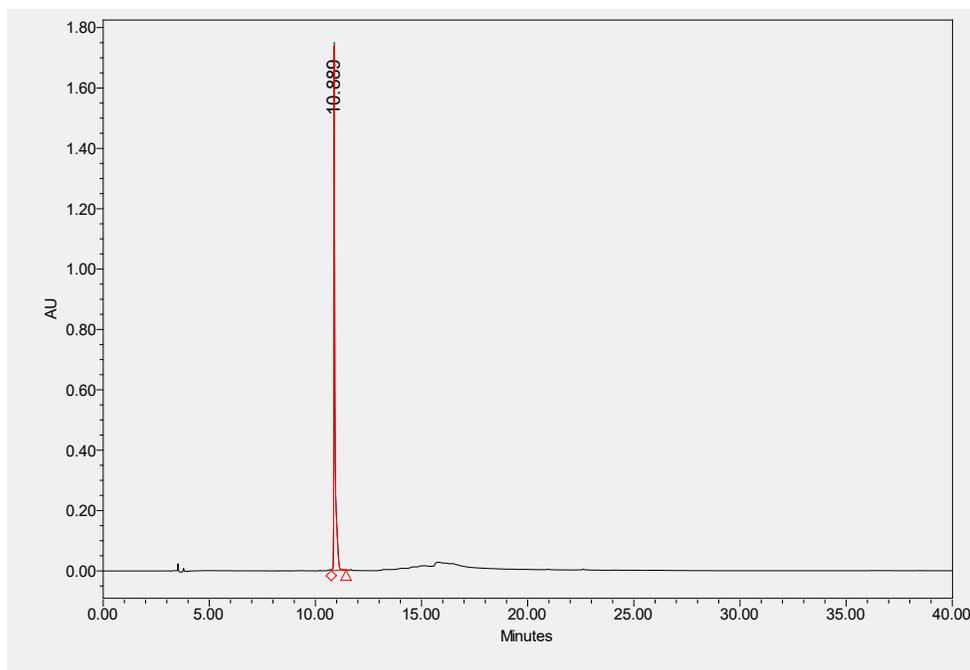


Figura 6. Cromatograma en HPLC de la fracción 109-130 con fase móvil de CH₂Cl₂:Hexano (95:5), flujo: 1 mL/minuto, volumen de inyección: de 10 µL, longitud de onda de detección: 254nm.

5.4. Identificación del compuesto aislado (“mavg-CG-4”)

Para la identificación del componente único presente en la fracción 109-130, se recurrió a la resonancia magnética nuclear (RMN), para lo cual se obtuvieron los siguientes espectros: RMN ^1H , COSY, ^{13}C , APT, HSQC y HMBC.

Como se observa en el cromatograma HPLC (Figuras 2 y 3) y en los espectros de RMN (^1H y ^{13}C) (Figuras 4 y 6), la fracción “mavg-CG-4” se obtuvo con un grado de pureza muy satisfactorio. La determinación de su estructura química se inició con la observación de sus espectros de RMN de ^{13}C y APT. En dichos espectros (Figuras 7 y 8), se observan 12 señales en total, 3 de las cuales se encuentran en la región de los carbonos aromáticos ($\delta = 132.4$, 130.8 y 128.8).

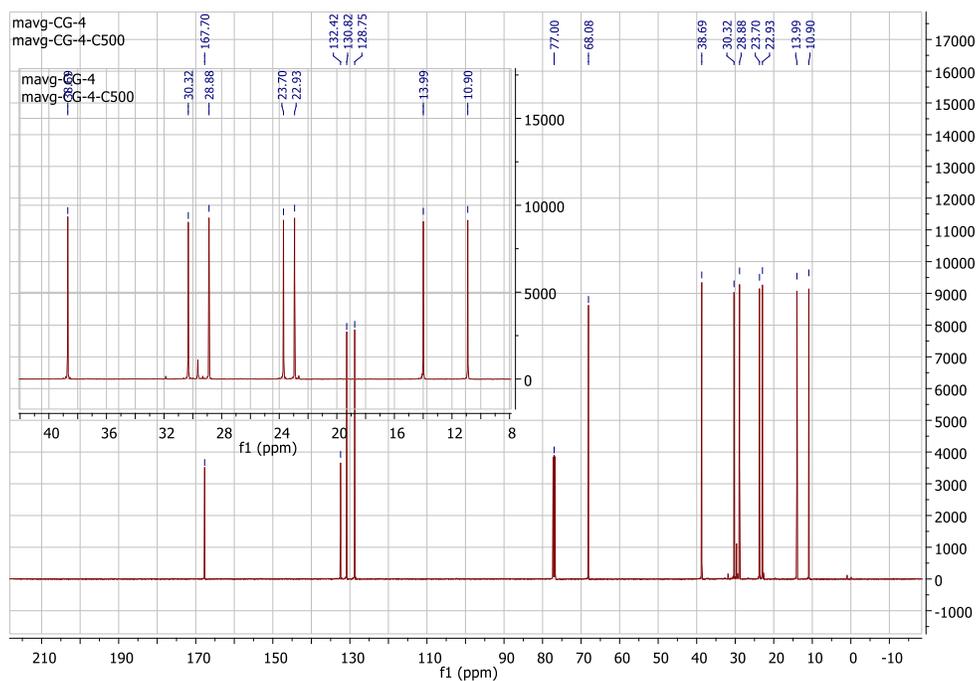


Figura 7. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto mavg-CG-4 (125 MHz).

Evidentemente, este número reducido de señales aromáticas (únicamente 3) indicaba una superposición de señales y cierta simetría en el patrón de

sustitución del anillo aromático. Por su intensidad relativamente mayor, las señales en 128.8 ppm y 130.8 ppm fueron asignadas empíricamente a carbonos hidrogenados, mientras que la señal en 132.4 ppm correspondió a carbonos aromáticos cuaternarios, lo cual se comprobó mediante el experimento APT (Figura 8), en donde las señales con fase positiva representan CH y CH₃, mientras que las de fase negativa se asignaron a los CH₂ y a los carbonos cuaternarios. Resumiendo, y en base a la simetría de la molécula, el espectro APT mostró un total de 6 metinos (cuatro de ellos aromáticos y dos alifáticos), cuatro metilos (en $\delta = 10.9$ y 14.0), cuatro carbonos cuaternarios (dos de ellos C=O y dos aromáticos) y 10 metilenos, dos de ellos oxigenados ($\delta 68.1$) y ocho alifáticos (δ desde 38.7 hasta 10.9 inclusive).

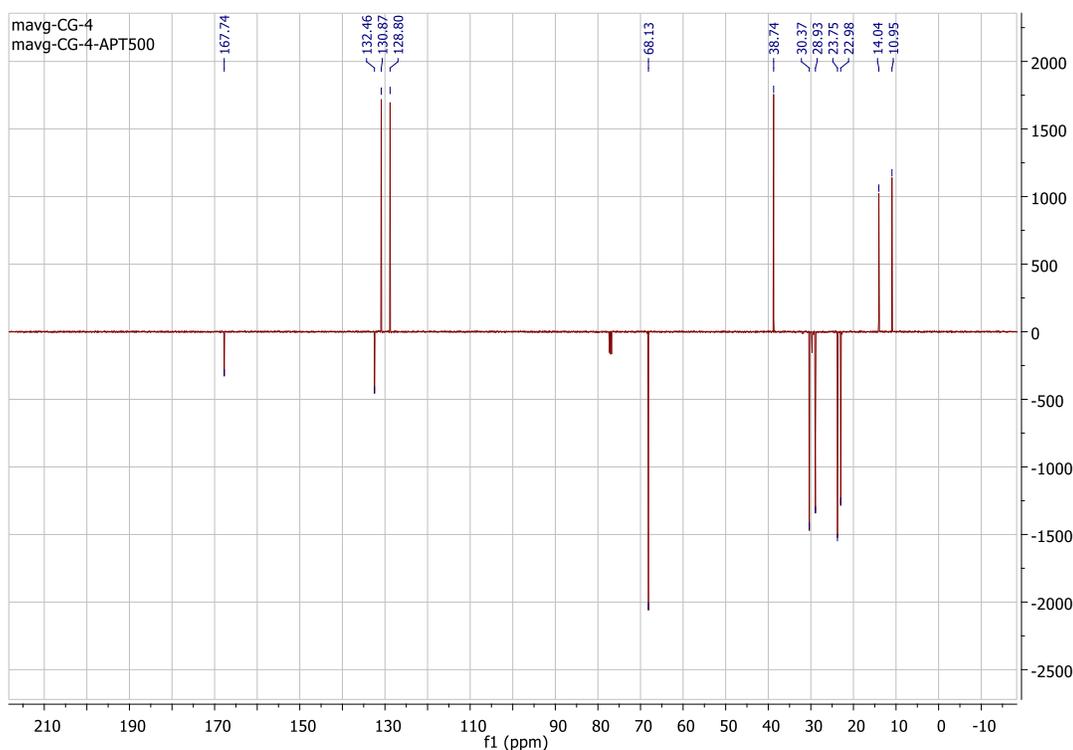


Figura 8. Espectro de RMN de ¹³C, modalidad APT de mavg-CG-4 (125 MHz).

Este balance preliminar hace pensar en un patrón de sustitución 1,4, o 1,2, excluyendo el patrón 1,3, el cual generaría 4 señales aromáticas diferentes (4 diferentes tipos de C aromáticos). Sin embargo, teniendo en cuenta las

constantes de acoplamiento (J) calculadas para esos metinos aromáticos con señales dd ($J \cong 5.35$ Hz y 3.35 Hz) en $\delta = 7.63$ y $\delta = 7.45$ en el espectro de RMN de ^1H (Figura 9), se determinó que la sustitución estaba en posición *orto*, debido a que esos valores de J no son atribuibles a ^1H en posición *meta* con la J característica de 0-3 Hz o *para*, con una J característica de 0-1 Hz.

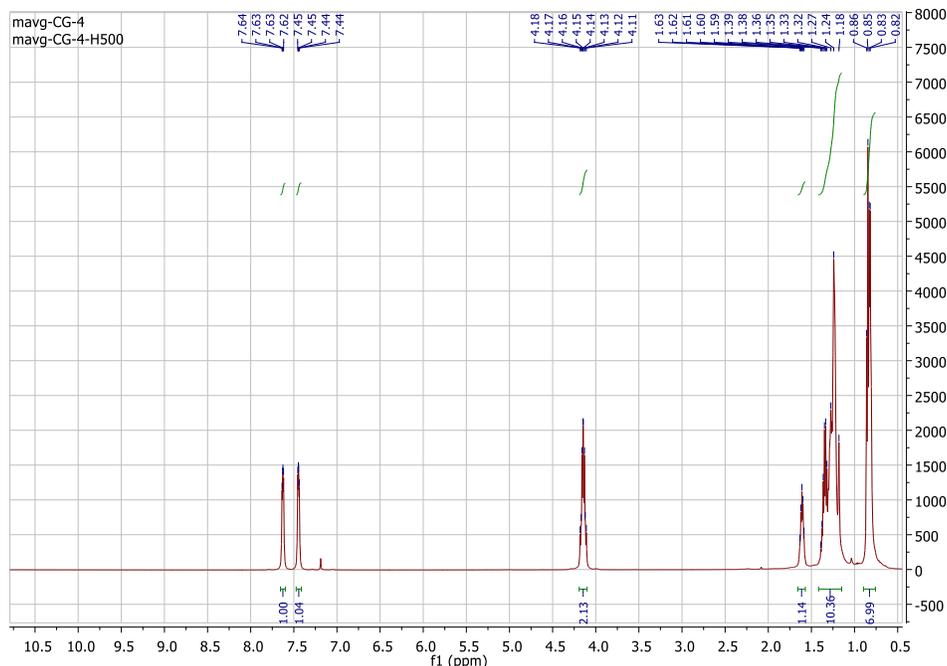


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H completo de la muestra mavg-CG-4.

Cada una de esas dos señales, con área bajo la curva de 1.0 tenía que representar a 2 H. Por lo tanto, la señal en $\delta = 4.15$ (área bajo la curva = 2.0), que en el HSQC (Figura 10) interacciona con la señal en $\delta = 68.1$ tenía que integrar para 4 H de dos metilenos equivalentes, debido a la simetría de la molécula. Este multiplete en $\delta = 4.15$ tiene acoplamiento en el espectro COSY (Figura 11) con la señal en $\delta_{\text{H}} = 1.61$, H que a su vez está unido al C en $\delta = 38.7$ (HSQC) (Figura 10) que es un metino (CH) según el espectro APT (Figura 8). En el espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY (Figura 10), dicho metino se acopla además con el multiplete en $\delta = 1.35$ de la región de los metilenos. Por lo tanto, la ramificación en dicho metino no incluye un grupo metilo.

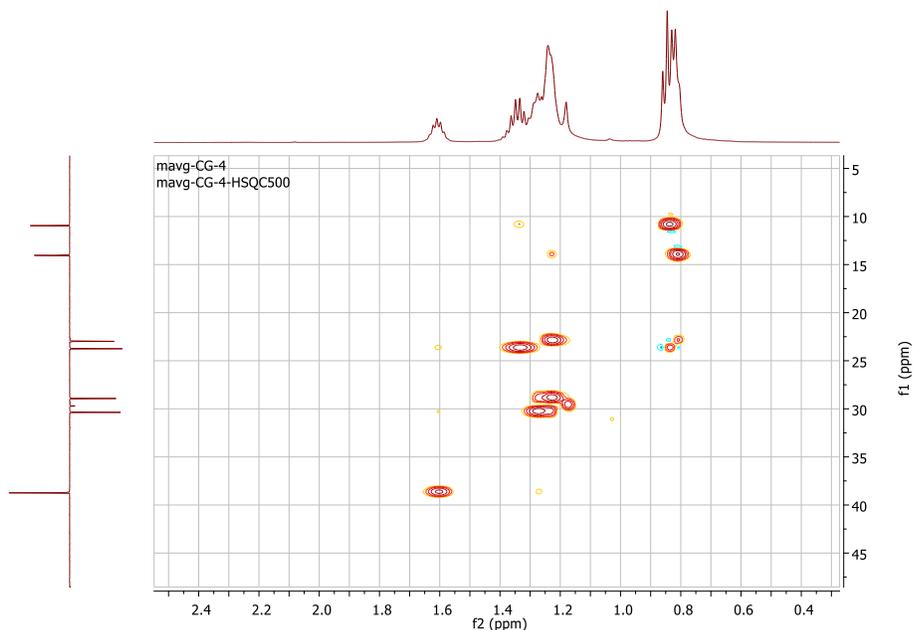


Figura 10. Espectro de correlación bidimensional ^1H - ^{13}C modalidad HSQC de la muestra mavg-CG-4.

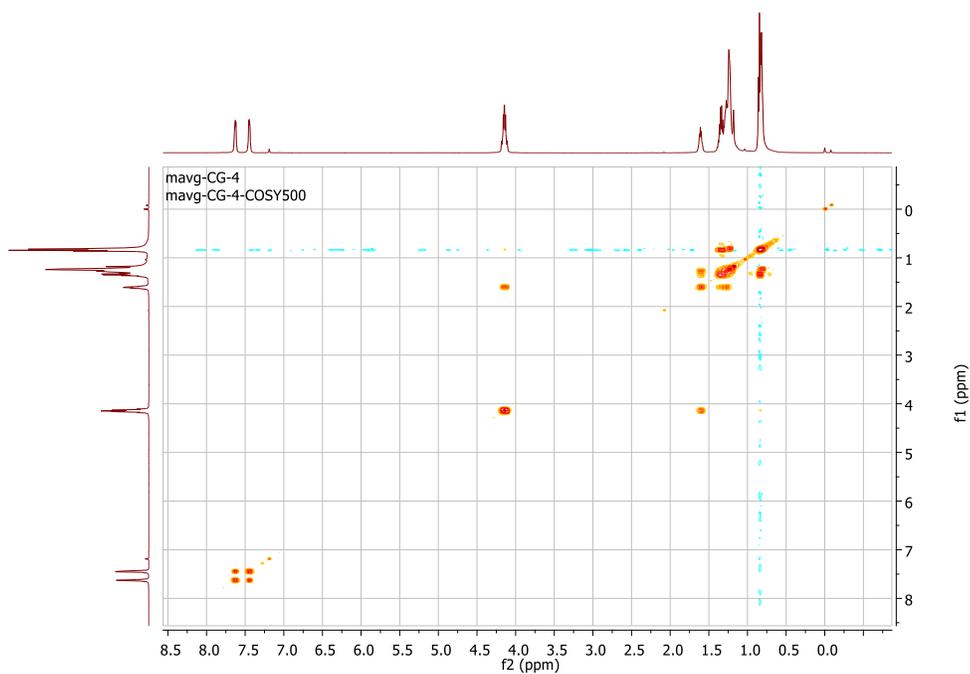


Figura 11. Espectro ^1H - ^1H COSY del compuesto mavg-CG-4.

En la región de campo bajo del espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 7 y 8), la señal en 167.7 ppm indicaba la presencia en la molécula de grupo carbonilo de

éster (Silverstein y col., 2005), que por su intensidad, comparada con la señal en 132.4 ppm, había de representar dos carbonilos igualmente equivalentes entre sí. Por su parte, la señal en 68.1 ppm indicaba por su posición que se trataba de un carbono oxigenado, el cual fue reconocido como un metileno a través del experimento APT (Figura 8). Las señales ubicadas entre 10.0 ppm y 40.0 ppm correspondieron a carbonos alifáticos de la cadena carbonada del éster.

Todas esas características espectroscópicas indicaron la estructura de un diéster ftálico con sustitución simétrica en posición 1,2, coincidiendo con la estructura del di-(2-etilhexil) ftalato (DEHF) (Figura 12) (Du y col., 2006; Sanna y col., 2015), identificado previamente como componente químico genuino en organismos vivos como ya se ha descrito anteriormente (ver punto 1.6.1).

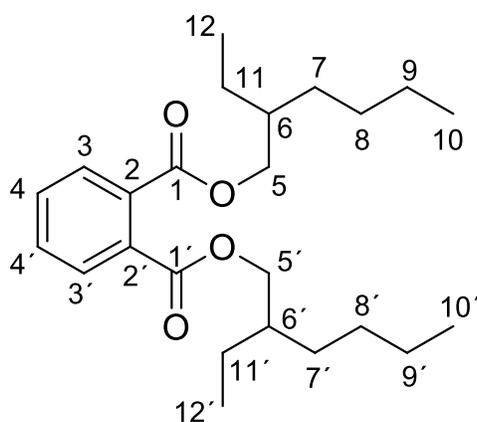


Figura 12. Estructura del di-(2-etilhexil)ftalato (DEHF)

5.5 Significado del hallazgo de este diftalato en esta planta medicinal

La cantidad obtenida del DEHF(132 mg) en esta fracción vasorrelajante estudiada en el presente trabajo debe considerarse inusualmente alta y por lo tanto, un constituyente natural de la planta colectada en esta zona particular de Querétaro. Esta idea se fortalece debido a que solamente esta fracción de la columna contuvo éste, y únicamente este compuesto, a pesar de que se siguieron usando los mismos disolventes durante toda la elución de la columna. Aunque se ha reportado la actividad antimicrobiana de algunos ftalatos, su

actividad dañina para la salud ha sido la más relevante, ya que varios de esos compuestos han sido asociados con efectos tan contradictorios como carcinogénicos y antitumorales. En particular, al DEHF, se le ha asociado con una eficacia en el tratamiento de leucemia mieloide aguda *ex vivo*, pero también como disruptor endócrino (ver punto 1.6.2), la actividad más temida de los ftalatos que causan efectos estrogénicos y potencialmente muy cancerígenos. Por lo tanto, la presencia del DEHF en esta planta medicinal usada a nivel tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos cardiovasculares como en casos de hipertensión, de muerte cardíaca, de infarto no mortal a miocardio y de hospitalización debida a falla cardíaca progresiva en pacientes con falla cardíaca grave (Ver punto 1.1.1), debe tenerse en cuenta en el momento de la obtención de extractos estandarizados, para descartar efectos secundarios graves.

6. CONCLUSIÓN

Se aisló y caracterizó plenamente el di-(2-etilhexil)ftalato (DEHF) como uno de los constituyentes químicos genuinos presentes en la fracción metanólica estudiada con actividad vasorrelajante. Este compuesto, al igual que todos los ftalatos, reconocidos todos como tóxicos, es usualmente considerado como contaminante común hecho por la industria y presente en materiales de uso diario por la población. Sin embargo, la alta cantidad encontrada, aunada al hecho de que se ha caracterizado como constituyente genuino de diferentes organismos (plantas, algas, hongos, bacterias), no descarta que sea un constituyente propio de este espécimen vegetal en particular. Este hecho ha de tenerse en cuenta si se contempla la obtención de un extracto estandarizado con potenciales usos medicinales para tratar problemas cardiovasculares, lo cual es el objetivo principal del proyecto.

7.-REFERENCIAS

Agas D, Sabbieti MG. Endocrine disruptors and bone metabolism. Arch Toxicol **2012**;87:735-751.

Ahumada C, Sáenz T, Garcia D, De la Puerta R, Fernández A, Martínez E. The effects of a triterpene fraction isolated from *Crataegus monogyna* Jacq. on different acute inflammation models in rats and mice. Leukocyte migration and phospholipase A₂ inhibition. J Pharm Pharmacol **1997**;49:329-331.

Akulova Z. *Crataegus gracilior* J. B. Phipps [monografía en internet] Encyclopedia of Life, **2014** [consultado 2017 abril 24]. Disponible en: <http://eol.org/pages/633727/overview>.

Al-Assaf AH, Chemopreventive effect of corosolic acid in human hepatocellular carcinoma cells. Afr J Biotechnol **2013**;12(19):2733-2742.

and their therapeutic implications. Nat Prod Rep **2006**;23:394-411.

Babu B y Wu JT. Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria. Sci Total Environ **2010**;410:4969-4975.

Calgiani A, Malavasi G, Pelle G, Maseglia A, Tognolini M, Bruni R. A simple GC-MS method for the screening of betulinic, corosolic, maslinic, oleanolic and ursolic acid contents in commercial botanicals used as food supplement ingredients. Food Chem **2013**;136:735-741.

Chang CL, Chen HS, Shen YC, Lai GH, Lin PK, Wang CM, Phytochemical composition, antioxidant activity and neuroprotective effect of *Crataegus pinnatifida* fruit. S Afr J Bot **2013**;88:432-437.

Chen CY. Biosynthesis of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) from red alga-*Bangia atropurpurea*. Water Res **2004**;38:1014-1018.

Chu-Tse W, Xue-Tao P, Jun-Rong C, Hui-HAU X. A new pharmacological activity of dibutyl phthalate (DBP) on selective elimination of tumor cell from bone marrow. Leuk Res **1993**;17:557-560.

Çitoğlu GS, Acikara OB. Column chromatography for triterpenoids and flavonoids. Chromatography and its applications. **2012**. InTech de

<http://www.intechopen.com/books/chromatography-and-its-applications/column-chromatography-of-triterpenoids-and-flavonoids>.

Du Q, Shen L, Xiu L, Jerz P, Winterhalter P. Di-2-ethylhexyl phthalate in the fruits of *Benincasa hispida*. Food Addit Contam **2006**; 23(6): 552–555.

Edwards JE, Brown PN, Talent N, Dickinson TA, Shipley PR. A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. Phytochemistry **2012**;79:5-26.

Gao PY, Li LZ, Peng Y, Li FF, Niu C, Huang XX, Ming M, Song SJ. Monoterpene and lignan glycosides in the leaves of *Crataegus pinnatifida*. Biochem Syst Ecol **2010**;38:988-992.

Griffiths DW, Robertson GW, Shepherd T, Nicholas A, Birch EN, Gordon SC, Woodford JAT. Comparison of the composition of epicuticular wax from red raspberry (*Rubus idacus* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) flowers. Phytochemistry **2000**;55:111-116.

Hernández-Pérez A, Bah M, Ibarra-Alvarado C, Rivera-Cruz JF, Rojas-Molina A, Rojas-Molina JI, Cabrera-Luna JA, Aortic relaxant activity of *Crataegus gracilior* Phipps and identification of some of its chemical constituents. Molecules **2014**;19:20962-20974.

Holubarsch CJF, Colucci WS, Meinertz T, Gaus W, Tendora M. The efficacy and safety of *Crataegus* extract WS®1442 in patients with heart failure: The SPICE trial on behalf the survival and prognosis: Investigation of *Crataegus* extract WS®1442 in CHF (SPICE) trial study group. Eur J Heart Fail **2008**;10:1255-1263.

Husein AI, Ali-Shtayed MS, Jamous RM, Jondi WJ, Zatar NAA. Phthalate derivatives are naturally occurring in *Arum Palaestinum*. Int J Curr Res Aca Rev **2014**;2(9):195-203.

Ikeda T, Ogawa Y, Nohara T. A new triterpenoid from *Crataegus cuneata*. Chem Pharm Bull. **1999**;47:1487-1488.

Keskin N, Mammadov R, Ili P. The effects of *Crataegus aronia* var. dentata Browicz extract on biochemical in apoptosis in partially hepactomized liver in rats. Bosn J Basic Med Sci **2012**;12(3):177-181.

Kumar D, Arya V, Bhat ZA, Khan NA, Prasad ND. The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives. *Rev Bras Farmacogn* **2012**;22(5):1187-1200.

Kuo RY, Qian K, Morris-Natschke SL, Lee HK. Plant derived triterpenoids and analogues as antitumor and anti-HIV agents. *Nat Prod Rep* **2009**;26:1321-1344.

Lee KH, Kim JH, Lim DS, Kim CH. Anti-leukemic and anti-mutagenic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate isolated from *Aloe vera* Linne. *J Pharm Pharmacol* **2000**;52:593-598.

Lee MS, Thuong PT. Stimulation of glucose uptake by triterpenoids from *Weigella subsesillis*. *Phytother Res* **2010**;24:49-53.

Li H. Effects of vasoactive chinese herbs on the endothelial NO system, recent advances in theories and practice of Chinese medicine. InTech; **2012**:267-282 disponible en <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-theories-and-practice-of-chinese-medicine/effects-of-vasoactive-chinese-herbs-on-the-endothelial-no-system>.

Li LZ, Gao PY, Song SJ, Yuan YQ, Liu CT, Hung XX, Liu QB. Monoterpenes and flavones from the leaves of *Crataegus pinnatifida* with anticoagulant activities. *J Funct Foods* **2015**;12:237-245.

Lin CC, Huan CY, Mong HC, Chan CY, Yin MC. Antiangiogenic potential of three triterpenic acid in human liver cells. *J Agric Food Chem* **2011**;59:755-762

Liu P, Yang B, Kallio H. Characterization of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var Major) fruit by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chem* **2010**;121:1188-1197.

Liu P. Composition of hawthorn (*Crataegus spp.*) fruits and leaves and emblic leafflower (*Phyllanthus emblica*) fruits. University of Turku, **2012**.

López-Corona MGB, Identificación y cuantificación del ácido clorogénico y de flavonoides presentes en hojas y frutos de *Crataegus gracilior* Phipps. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro, 2013.

Lovekamp TN, Davis BJ. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **2001**;172: 217-224.

Lozano-Mena G, Sánchez-González M, Juan ME, Planas JM. Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives- a promising nutraceutical? *Molecules* **2014**;19:11538-11559.

Malekinejad H, Snafie-Irannejad V, Hobbenaghi R, Tabatabaie SH, Moshtaghion SM. Comparative protective effect of hawthorn berry hydroalcoholic extract, atorvastatin and mesalazine on experimentally induced colitis in rats. *J Med Food* **2013**;16(7):593-601.

Martelanc M, Vovk I, Simonovska B. Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **2009**;1216:6662-6670.

McCune ML. A Review of the Antioxidant Actions of Three Herbal Medicines (*Crataegus monogyna*, *Ginkgo biloba*, and *Aesculus hippocastanum*) on the Treatment of Cardiovascular Diseases. En: *Bioactive Food as Dietary Interventions for Cardiovascular Disease*. San Diego, California USA: Elsevier Inc, **2013**:243-253.

Namikoshi M, Fujiwara T, Nishikawa T, Ukai K. Natural abundance ¹⁴C content of dibutyl phthalate (DBP) from three marine algae. *Mar Drugs* **2006**;4:290-297.

Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* **2016**;79:629-661.

Qiao A, Wang Y, Xiang L, Zhang Z, He X. Novel triterpenoids isolated from hawthorn berries functioned as antioxidant and antiproliferative activities. *J Funct Foods* **2015**;13:308-315.

Ramachandran S, Prasad NR. Effect of the ursolic acid, a triterpenoid antioxidant on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. *Chem Biol Interact* **2008**;176:99-107.

Razaei-Golmisheh A; Malekinejad H, Asri-Rezaei S, Farshid AA, Akbari P. Hawthorn ethanolic extracts with triterpenoids and flavonoids exerts

hepatoprotective effects and suppress the hypercholesterolemia-induced oxidative stress in rats. Iran J Basic Med Sci **2015**;18:690-699.

Roy RN, Laskar S, Sen SK. Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2. Microbiol Res **2006**;161:121-126.

Rzedowski J, Calderon-de-Rzedowski G. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Pátzcuaro, Michoacán, México: Editorial INECOL Instituto de Ecología A.C, **2005**;fascículo 135:48-54.

Saeidnia S, Abdollahi M. Are medicinal plants polluted with phthalates? DARU **2013**;21:43.

Sáenz MT, Ahumada MC, García MD. Extracts from *Viscum* and *Crataegus* are cytotoxic against larynx cancer cells. Z Naturforsch C **1997**;52c:42-44.

Saleem M, Nazir M, Akhtar N, Onocha PA, Riaz N, Jabbar A, Ali MS, Sultana N. New phthalates from *Phyllanthus muellerianus* (Euphorbiaceae). J Asian Nat Prod Res **2009**;11:974-977.

Sanna R, Medas D, Podda F, Meneghini C, Casu M, Lattanzi P, Scorciapino MA, Floris C, Cannas C, De Giudici G. Binding of bis-(2-ethylhexyl) phthalate at the surface of hydrozincite nanocrystals: An example of organic molecules absorption onto nanocrystalline minerals. J Colloid Interface Sci **2015**;457:298–306.

Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ.. Spectrometric Identification of Organic compounds. 7^a edition. USA:John Wiley & Sons, Inc., 2005:227-228.

Somova LI, Shode FO, Ramnanan P, Nadar A. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europea* subspecies *Africana* leaves. J Ethnopharmacol **2003**;84:299-305.

Song SJ, Li LZ, Gao PY, Peng Y, Yang JY, Wu CF. Terpenoids and hexenes from the leaves of *Crataegus pinnatifida*. Food Chem **2011**;129:933-939.

Sun H, Fang WS, Wang WZ, Hu C. Structure-activity relationships of oleanane- and ursane-type triterpenoids. Bot Stud **2006**;47:339-368.

Wang C. *Crataegus pinnatifida* Bge (Shanza, Hawthorn fruit) in dietary Chinese herbs. Capital medical university, Beijing, China. **2015**: 355-366.

- Wang** T, An Y, Zhao C, Han L, Boakye-Yiadom M, Wang W, Zhang Y. Regulation effects of *Crataegus pinnatifida* leaf on glucose and lipids metabolism. J Agric Food Chem **2011**;59:4987-4994.
- Wang** WL, Zhou X, Liu YL Xu QM, Li XR, Yang SL. Two new 20 α (H)-ursane-type triterpenoids from *Ilex cornuta* and their cytotoxic activities. J Asian Nat Prod Res **2013**;16:175-180.
- Wu** J, Peng W, Qin R, Zhou H. *Crataegus pinnatifida*: chemical constituents, pharmacology and potential applications. Molecules **2014**;19:1685-1712.
- Xu** P, Wang P, Yen B, Cheng Y, Li Q, Lei H, Structural and bioactive studies of terpenes and cyclopeptides from genus *Rubia*. Chem Cent J. **2013**;7:81-
- Xu** Y, Ge R, Du J, Xin H, Yi T, Sheng J, Wang Y, Ling C. Corosolic acid produces apoptosis through mitochondrial pathway and caspases activation in human cervix adenocarcinoma HeLa cells. Cancer Lett **2009**;284:229-237.
- Yarnell** E. Botanical medicine used for kidney disease in the United States. Iran J Kidney Dis **2012**;6:407-418.