

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

“CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE UNA FRACCIÓN  
VASORRELAJANTE DEL EXTRACTO METANÓLICO  
FOLIAR DE *Crataegus gracilior* PHIPPS (*ROSACEAE*)”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

PRESENTA

Q.A. AMANDA KIM RICO CHÁVEZ

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2016.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

“Caracterización química de una fracción vasorrelajante del extracto metanólico  
foliar de *Crataegus gracilior* Phipps (Rosaceae)”

### TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

#### Presenta:

Q.A. Amanda Kim Rico Chávez

Dirigido por:

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Dr. Mamadou Moustapha Bah  
Presidente

  
Firma

Dra. Alejandra Rojas Molina  
Secretaria

Alejandra Rojas M.  
Firma

Dr. José Alejandro García Arredondo  
Vocal

  
Firma

Dr. José Fausto Rivero Cruz  
Sinodal

Rivero Cruz José F.  
Firma

Dr. Miguel Angel Ramos López  
Sinodal

  
Firma

  
M.S.P Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad de Química

  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

## RESUMEN

Los extractos de plantas del género *Crataegus* son actualmente el principal tratamiento alternativo de las enfermedades cardiovasculares en Europa, lo que se ha justificado con diversas investigaciones en las que se demostraron sus efectos vasodilatadores, hipotensivos y cardioprotectores. Estos efectos se atribuyen a la gran variedad de constituyentes químicos que se puede encontrar en estos extractos y cuya caracterización podría permitir el establecimiento de los mecanismos mediante los cuales actúan en el organismo, así como la estandarización de su composición química con el fin de asegurar su efecto terapéutico. Las evidencias de los efectos favorables de distintas especies de *Crataegus* sobre el sistema cardiovascular son un buen indicador del potencial de la especie mexicana *Crataegus gracilior* (Rosaceae) como agente medicinal y como una fuente de compuestos farmacológicamente activos, por lo que en este estudio se realizó el análisis de los constituyentes químicos de una fracción del extracto metanólico de esta especie, que presentó un efecto vasorrelajante eficaz en una fase previa de este proyecto. El análisis consistió en la aplicación de distintas técnicas de separación, principalmente las cromatografías en columna y capa fina, con la finalidad de disminuir la complejidad de la muestra. Posteriormente, se purificaron algunos compuestos haciendo uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución. Finalmente, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear en sus diferentes modalidades permitió la elucidación completa de las estructuras químicas de tres moléculas: un *nor*-triterpeno monoglicosilado y dos flavanoles, uno de ellos sustituido por una cumarina. Conviene destacar que éste es el primer reporte de la presencia de este derivado cumarínico en el género *Crataegus* y el segundo en el reino vegetal, ya que sólo ha sido descrito en *Anthocephalus cadamba* (Rubiaceae).

**(Palabras clave:** Productos naturales, *Crataegus gracilior*, flavanoles, triterpenos)

## SUMMARY

Nowadays, extracts from plants of the genus *Crataegus* are the main alternative treatment of cardiovascular disease in Europe. This application has been supported by several research works through which the vasodilator, hypotensive and cardioprotective effects of these extracts have been demonstrated. These effects have been attributed to the great diversity of chemical constituents present in the extracts and whose characterization may promote the elucidation of the mechanisms by which the extracts exert their activity on the human body, and could also lead to the optimization of their efficacy and safety of their therapeutic use. The up to now proven evidence about the beneficial effects that different extracts from *Crataegus* species have on the cardiovascular system is an excellent indicator of the medicinal potential of *Crataegus gracilior* (Rosaceae), but also of its importance as a source of pharmacologically active compounds. Based on this fact, a study of the chemical constituents of a vasoactive chromatographic fraction from the methanolic extract obtained from the leaves of the Mexican species *C.gracilior* was undertaken. Different separation techniques, including column and thin layer chromatographies were employed in order to obtain samples of less chemical complexity. Afterwards, the individual constituents in these samples were purified by high-performance liquid chromatography. Different nuclear magnetic resonance spectroscopy techniques were used to establish the complete chemical structures of the three main purified molecules, a monoglycosylated *nor*-triterpene and two flavanols, one of which is substituted by a coumarin. It is worth mentioning that this is the first report of the presence of this coumarin derivative in this plant genus and the second in the plant kingdom, since it has only been described in *Anthocephalus cadamba* (Rubiaceae).

**(Keywords:** Natural products, *Crataegus gracilior*, flavanols, triterpenes)

*A ti lector, que le das significado a estas palabras con tu interés.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de  
manutención otorgada durante mis estudios de maestría.

Al programa de Posgrado en Ciencias Químico Biológicas por permitirme el  
ingreso y el desarrollo de esta investigación.

Al Fondo para el Fortalecimiento de la Investigación UAQ-2015 (FOFI-UAQ con  
clave de registro FCQ201618) por el financiamiento para realizar los análisis de  
este proyecto.

A mi compañero, el M. en C. Eloy Rodríguez de León por hacer posibles los  
análisis de RMN y su valiosísima participación en la elucidación estructural de los  
compuestos aquí aislados.

A mi asesor, el Dr. Moustapha Bah, por su esfuerzo en la realización de este  
trabajo y la amable consideración que tiene hacia mi persona.

A mis sinodales, por sus valiosas observaciones y por siempre atender con  
premura todo asunto relacionado con mi formación y los resultados de este  
proyecto.

A mi familia y mis amigos, por el inconmensurable apoyo que sin duda me permitió  
llegar a terminar este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Fabián, por la enorme ayuda y por  
siempre hacer agradable nuestro entorno de trabajo.

# ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iii
ÍNDICE DE TABLAS .....	v
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 El género <i>Crataegus</i> .....	3
2.1.1 Características botánicas, distribución geográfica y taxonomía .....	3
2.1.2 Etnobotánica y características fitoquímicas .....	4
2.1.3 Propiedades farmacológicas .....	7
2.1.4 Extractos estandarizados de <i>Crataegus</i> .....	10
2.2 <i>Crataegus gracilior</i> Phipps .....	10
2.3 Impacto social de las enfermedades cardiovasculares .....	12
2.4 Técnicas de análisis fitoquímico .....	13
2.4.1 Cromatografía .....	14
2.4.2 Resonancia Magnética Nuclear .....	17
3. JUSTIFICACIÓN .....	19
4. HIPÓTESIS .....	21
5. OBJETIVOS .....	22
5.1 Objetivo general .....	22
5.2 Objetivos particulares .....	22
6. METODOLOGÍA .....	23

6.1	Obtención del material de partida .....	23
6.2	Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la F9 .....	23
6.3	Materiales y equipos .....	24
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
7.1	Fraccionamiento y purificación.....	26
7.2	Análisis de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear .....	38
7.2.1	Elucidación estructural del compuesto <b>1</b> .....	38
7.2.2	Elucidación estructural del compuesto <b>2</b> .....	42
7.2.3	Elucidación estructural del compuesto <b>3</b> .....	46
8.	CONCLUSIONES .....	51
9.	CONSIDERACIONES BIOÉTICAS Y DE SEGURIDAD.....	52
10.	REFERENCIAS .....	53
11.	ANEXO.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Hojas y frutos de <i>Crataegus mexicana</i>	3
2	Estructura básica de los flavonoles (A) y flavonas (B) encontrados en hojas y flores de <i>Crataegus</i>	6
3	Estructura de una procianidina oligomérica que consiste en tres monómeros de epicatequina	7
4	Distribución de <i>Crataegus</i> en México, estimada a partir de un Análisis de Información Geográfica	11
5	Distribución conocida de <i>C. gracilior</i> y <i>C. mexicana</i> en el Bajío y zonas adyacentes	12
6	Cromatograma analítico de la fracción F <sub>2-4</sub>	27
7	Cromatograma analítico de la fracción F <sub>2-10</sub>	28
8	Cromatograma analítico de la fracción F <sub>2-12</sub> . La línea verde muestra el porcentaje de B en la fase móvil	29
9	Espectros UV-Visible de los picos 1, 3 y 6 provenientes del cromatograma analítico de la fracción F <sub>2-12</sub>	30
10	Cromatograma preparativo de la fracción F <sub>2-12</sub>	31
11	Cromatograma analítico de la fracción F <sub>2-13</sub>	33
12	Cromatograma analítico de la fracción F <sub>3-10</sub>	35
13	Cromatograma analítico de la fracción F <sub>3-12</sub>	36

14	Cromatograma analítico de la fracción F <sub>3-16</sub>	37
15	Cromatograma analítico de la F <sub>3-17</sub>	38
16	Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto <b>1</b>	39
17	Estructura general de un flavan-3-ol	40
18	Estructura del compuesto <b>1</b> (epicatequina)	42
19	Estructura del compuesto <b>2</b> (6-hidroximarina-(4"→8)-(-)-epicatequina)	45
20	Estructura del compuesto <b>3</b> (daucosterol)	49

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Fracciones obtenidas de la separación por CC (CC-2) de los componentes de la fracción F9	26
2	Fracciones recolectadas de la separación por CLAR preparativa de los componentes de F <sub>2-12</sub>	32
3	Fracciones obtenidas de la separación por CC (CC-3) de los componentes de la fracción F <sub>2-13</sub>	34
4	Constantes espectroscópicas del compuesto <b>1</b> (500 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N como disolvente y estándar interno)	41
5	Constantes espectroscópicas del compuesto <b>2</b> (500 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, TMS como estándar interno)	44
6	Constantes espectroscópicas del compuesto <b>3</b> (500 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, TMS como estándar interno)	47

## 1. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales han sido utilizados desde hace miles de años para tratar enfermedades. La medicina tradicional y el uso de remedios herbolarios en diferentes preparaciones como tinturas, tés y otros extractos con fines terapéuticos son conocimientos que se han heredado generación tras generación y que continúan siendo parte esencial del perfil cultural de las poblaciones humanas. Con base en este conocimiento y el estudio de la etnobotánica se ha extraído y purificado una importante cantidad de compuestos con actividad farmacológica a partir de fuentes naturales vegetales.

Al respecto de estas fuentes, podemos afirmar que México es un país de gran riqueza, ya que tiene una extensión territorial vasta y a su vez se encuentra en una posición geográfica privilegiada, por lo que cuenta con una inmensidad de recursos naturales, así como con una diversidad climática y por lo tanto biológica sobresaliente; esto aunado a un riquísimo acervo cultural proveniente de las grandes civilizaciones que poblaron este territorio desde hace más de 4000 años, hace de nuestro país una fuente formidable de compuestos bioactivos.

A pesar de estas ventajas, gran parte de los recursos vegetales en México permanecen inexplorados. Muchas plantas, cuyos equivalentes asiáticos y europeos son objeto de intensa investigación en el ámbito medicinal, son apenas mencionadas en la investigación mexicana. Uno de esos recursos está integrado por las especies del género *Crataegus*. Varios autores difieren en el número de especies que se pueden estimar para este género; la cifra varía entre 140 y 300. Sin embargo, es bien sabido que más de la mitad del total de estas especies se encuentra en América del Norte y varias son nativas e incluso endémicas de México.

Las plantas del género *Crataegus*, mejor conocidas en nuestro país como “tejocote” han sido utilizadas desde la época prehispánica como alimento, y como un remedio tradicional de distintas enfermedades del sistema respiratorio. En

Europa y Canadá se les ha dado uso en el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares, y además constituyen el ingrediente principal de las formulaciones para aliviar malestares gastrointestinales e hipertensión en la medicina tradicional china. Actualmente en Europa, la utilización de extractos estandarizados de *Crataegus* es el principal tratamiento alternativo de las enfermedades cardiovasculares y en diversas investigaciones se han demostrado sus efectos vasodilatadores, hipotensivos, antioxidantes y cardioprotectores.

Estos hallazgos son de suma relevancia ya que las enfermedades cardiovasculares son en la actualidad la principal causa de muerte a nivel mundial, y por lo tanto, un factor de gran impacto en la población; lo que hace imprescindible el desarrollo de terapias alternativas a las ya existentes, que sean efectivas, asequibles y que carezcan de efectos adversos. En este sentido, las evidencias de los efectos favorables de muchas otras especies de *Crataegus* sobre el sistema cardiovascular son un buen indicador del potencial de *Crataegus gracilior*, no sólo como agente terapéutico, sino también como una fuente de compuestos farmacológicamente activos.

Con base en los resultados obtenidos durante las pruebas farmacológicas que se realizaron a extractos metanólicos foliares de *Crataegus gracilior* en una fase previa de este proyecto, se presenta la siguiente propuesta, enfocada a enriquecer el conocimiento de los constituyentes químicos de la fracción cromatográfica que demostró tener el efecto vasorrelajante más eficaz. Los resultados que se generen podrían contribuir a fortalecer la justificación del uso de esta especie en el tratamiento de padecimientos cardiovasculares.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 El género *Crataegus*

#### 2.1.1 Características botánicas, distribución geográfica y taxonomía

*Crataegus* es un género de plantas perteneciente a la familia Rosaceae que está constituido por aproximadamente 140 especies conocidas a nivel mundial, de las cuales dos terceras partes son nativas de América del Norte y el resto de Asia Central, Asia Oriental y Europa (Núñez-Colín *et al.*, 2011).

Son árboles y arbustos que suelen estar provistos de espinas, con hojas alternas de láminas pecioladas, generalmente dentadas o lobadas. Las inflorescencias se presentan en forma de conjuntos corimbiformes terminales, simples o compuestos y muy rara vez se presentan las flores solitarias, las flores tienen sus brácteas presentes y son actinomorfas, hermafroditas, con ovario ínfero y cinco pétalos generalmente blancos aunque a veces rosados. Su fruto, como puede apreciarse en la Figura 1 es un pomo globoso o piriforme, de color amarillo a rojo en la madurez y contiene de una a cinco núculas, cada una con una o dos semillas (Rzedowski y Calderón-de-Rzedowski 2005).



Figura 1. Hojas y frutos de *Crataegus mexicana* (UBC Botanical Garden and Centre for Plant Research, 2009).

La taxonomía de este género es una de las más complejas de las plantas superiores, debido a que las especies que comprende presentan varias complicaciones reproductivas, como apomixis (Lo *et al.*, 2009), distintos niveles de ploidía (Talent *et al.*, 2005), pseudogamia, autoincompatibilidad gametofítica y brevedad del período de floración (Phipps *et al.*, 2003). Esta complejidad taxonómica ha llevado a estimar que el número de especies de *Crataegus* en realidad podría estar situado entre 140 y 300 (Edwards *et al.*, 2012).

Adicionalmente, para México sólo existen dos estudios taxonómicos del género. El primero fue realizado en 1909 por Eggleston y el más reciente, exclusivo de la región norte y parte del centro fue propuesto por Phipps en 2003, en el que se describen 13 especies de las cuales 9 son endémicas de este país. De entre los esfuerzos actuales para aumentar el conocimiento del género en México resaltan los realizados por Núñez-Colín *et al.*, quienes propusieron dos especies nuevas para la zona sur del país (Núñez-Colín *et al.*, 2008a), así como diversos estudios sistematizados de distribución geográfica (Núñez-Colín *et al.*, 2008b).

### 2.1.2 Etnobotánica y características fitoquímicas

Las especies del género *Crataegus* son conocidas por sus efectos sobre el sistema circulatorio y consumidas en una gran variedad de preparaciones medicinales en todo el mundo desde tiempos ancestrales. Su uso se ha reportado en la medicina tradicional china desde *Tang Ben Cao*, la primera farmacopea oficial en el mundo que data del año 659 de la era común (e.c) y, en Europa, se remonta al siglo I e.c, aunque su uso para tratar de manera específica enfermedades del corazón comenzó a mediados del siglo XVII (Chang *et al.*, 2002).

Gracias a que se ha demostrado su efectividad y la inexistencia de efectos adversos, el uso actual de *Crataegus* sigue siendo extendido tanto en preparaciones herbolarias como en fitomedicamentos (Büechli *et al.*, 2002), que son bien regulados, llevan un estricto control de la calidad y se producen y comercializan mayormente en Europa (Veit *et al.*, 2005) como la principal terapia alternativa para tratar enfermedades cardiovasculares.

En México, hay evidencia de la utilización de las especies del género *Crataegus* desde la época prehispánica. El nombre común para estas plantas es “tejocote”, palabra que proviene del náhuatl “texocotl” y que significa “fruto como piedra” (RAE, 2014). Tiene un uso muy generalizado, principalmente como alimento y como planta medicinal para el tratamiento de distintas afecciones cardiovasculares e incluso respiratorias como tos, gripe y asma (Arrieta *et al.*, 2010).

En la literatura actual, existen estudios que describen las características fitoquímicas de al menos 27 de las 140 especies conocidas que constituyen el género *Crataegus* y entre los compuestos mencionados en estos estudios, hasta la más reciente revisión de la literatura en 2012, se encuentran 49 flavonoides, cinco ácidos hidroxicinámicos, seis glúcidos, diez ácidos orgánicos o fenólicos, 26 terpenos y 56 constituyentes de los aceites esenciales (Edwards *et al.*, 2012). Cabe destacar de entre las fuentes citadas, el trabajo que se ha realizado en China para *C. pinnatifida*, la principal especie en esa zona y actualmente la mejor caracterizada, hecho que puede observarse en la reciente publicación de Wu *et al.* (2014).

De los constituyentes identificados en especies de *Crataegus*, varios son considerados compuestos con actividad farmacológica, siendo los más importantes los flavonoides (1.5% a 2% del peso) entre los que se pueden encontrar un grupo de flavonoles cuya estructura tiene como base la quercetina, el kaempferol y el 8-metoxikaempferol, mientras que la apigenina y la luteolina representan las estructuras básicas del grupo presente de flavonas; ambos tipos de estructuras pueden observarse en la Figura 2. Todos estos flavonoides existen casi exclusivamente como glicósidos, en los que suelen estar presentes los glúcidos  $\beta$ -D-glucosa,  $\alpha$ -L-ramnosa,  $\alpha$ -L-4-acetil-ramnosa, xilosa, arabinosa, rutinosa, y neohesperidosa. Entre los compuestos activos, también se han identificado procianidinas oligoméricas que también son un tipo de flavonoides, derivados de la catequina y la epicatequina (Figura 3), ácidos orgánicos triterpénicos (aproximadamente 0.6% del peso) como ácido ursólico, oleanólico y

crataególico y ácidos fenólicos como los ácidos clorogénico y caféico, así como algunas aminas y otros compuestos nitrogenados (Koch y Malek, 2011).

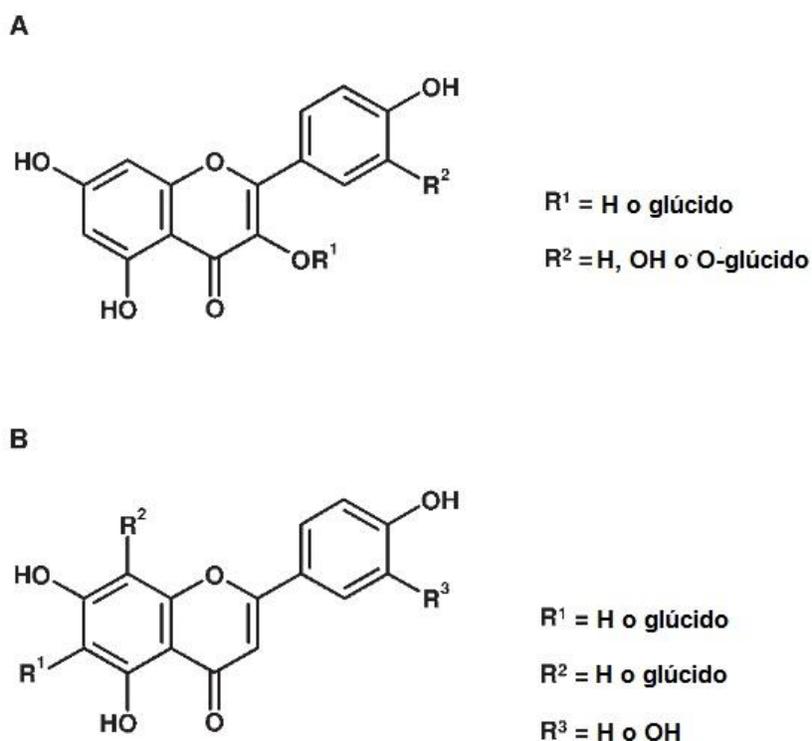


Figura 2. Estructura básica de los flavonoles (A) y flavonas (B) encontrados en hojas y flores de *Crataegus* (adaptada de Koch y Malek, 2011).

Los extractos de *Crataegus* son entonces una mezcla muy compleja de constituyentes, de los cuales muchos son bioactivos y como puede esperarse, se ha demostrado que interactúan a la vez con múltiples blancos farmacológicos, provocando diversos efectos en el organismo (Holubarsch *et al.*, 2008).

La información disponible sobre la fitoquímica de especies nativas de América del Norte incluye sólo una descripción del contenido de aceite esencial y compuestos volátiles así como limitados estudios quimiotaxonómicos, lo que es un hecho sorprendente y un importante nicho de oportunidad ya que las especies nativas de esta zona son más de la mitad de todas las especies conocidas de *Crataegus* (Phipps *et al.*, 2003).

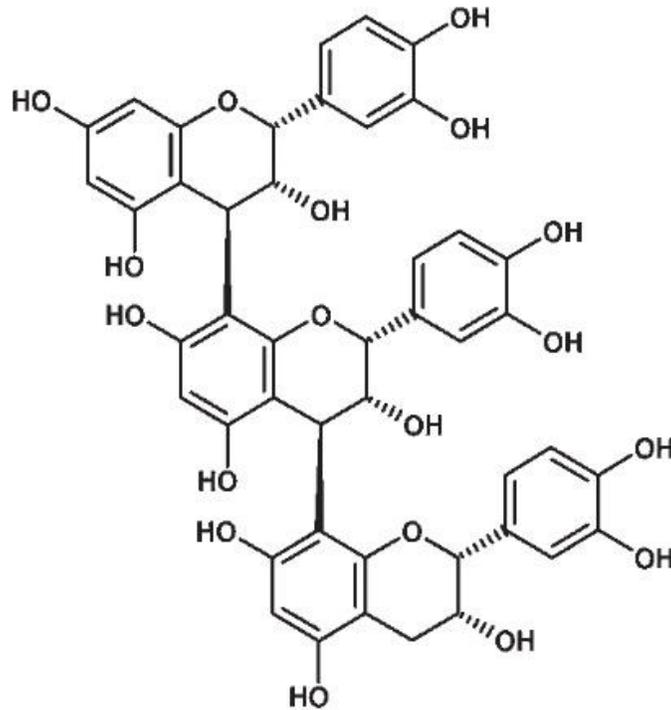


Figura 3. Estructura de una procianidina oligomérica que consiste en tres monómeros de epicatequina (Koch y Malek, 2011).

### 2.1.3 Propiedades farmacológicas

La principal actividad farmacológica que se le atribuye a *Crataegus spp* es la que ejerce sobre el sistema cardiovascular y de ella se derivan efectos antiarrítmicos, cardiotónicos, hipotensivos, hipolipídemicos y antioxidantes (Chang *et al.*, 2002).

Existen estudios que han demostrado la efectividad de los extractos comerciales y experimentales de *Crataegus* en la relajación del músculo liso de aorta de rata y arteria torácica humana (Brixius *et al.*, 2006) y tráquea de cobayo (Arrieta *et al.*, 2010), así como el aumento en el flujo sanguíneo en corazones aislados de ratas (Dood *et al.*, 2013).

Los efectos farmacológicos comprobados en estos estudios responden a varios mecanismos propuestos con base en el hallazgo de distintas evidencias. Por una parte, se ha demostrado que el efecto vasorrelajante es dependiente del endotelio,

lo que permite saber que los componentes del extracto de *Crataegus* actúan provocando la liberación de óxido nítrico (NO) a través de la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) (Brixius *et al.*, 2006), mecanismo que se atribuye a las procianidinas presentes en el extracto y no así a otros flavonoides (Kim *et al.*, 2000). Evidencias adicionales indican que la activación de eNOS provoca vasorrelajación adicionalmente por una estimulación de la ciclooxigenasa (COX) (Cuzzocrea y Salvemini, 2007), lo que aumenta la producción de prostaciclina, una hormona que relaja el músculo liso. En experimentos *in vitro* con tejido cardíaco humano, se ha demostrado que el extracto de *Crataegus* provoca un incremento en la contractilidad del miocardio dependiente de la concentración, que además es acompañado de un aumento transitorio en el calcio intracelular. Se propone que este efecto inotrópico positivo ocurre por una inhibición de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa independiente del Adenosín Monofosfato Cíclico o AMPc (Schwinger *et al.*, 2000).

Existen también reportes de pruebas que se han conducido sobre seres humanos y son, a pesar de las limitaciones estadísticas, las representaciones más realistas de los efectos que pueden tener los extractos de *Crataegus* en el organismo. Holubarsch *et al.* en 2008 publicaron los resultados de un estudio realizado sobre 2681 pacientes con afecciones cardíacas de nivel II y III según la escala NYHA (New York Heart Association) en el que se probó el extracto comercial de *Crataegus* (WS1442) que demostró tener un efecto favorable sobre la capacidad de realizar actividad física, la reducción de los síntomas de enfermedad y la mortalidad por evento cardíaco en los pacientes tratados.

Respecto al efecto hipolipidémico, se ha encontrado que los extractos metanólicos de los frutos de *C. oxyacantha* que fueron administrados a ratas expuestas a una dieta hiperlipídica, previnieron la elevación de los niveles de lípidos en el plasma, además de observarse una disminución significativa de los depósitos de lípidos en el hígado y la aorta de los modelos experimentales. No limitado a estos resultados, los extractos de tejocote aumentaron significativamente la actividad de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) en

ensayos *in vitro*, por lo que se considera útil también en el tratamiento de la aterosclerosis. Se cree que los flavonoides, triterpenos, saponinas y algunas aminas cardioactivas presentes en los extractos son los que a través de un efecto sinérgico actúan provocando estos resultados (Verma *et al.*, 2007).

En investigaciones que no se relacionan con el efecto sobre el sistema cardiovascular, se ha probado que algunos flavonoides y proantocianidinas aislados de *Crataegus sinaica* tienen efecto *in vitro* en contra del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Shahat, *et al.*, 1998), mientras que en otras, este mismo efecto se asocia con la presencia del triterpeno ácido maslínico, que demostró un efecto sobresaliente en la inhibición de la VIH-1 proteasa, por lo que es considerado un novedoso candidato potencial a agente terapéutico anti-VIH (Wang *et al.*, 2009). Asimismo, se ha demostrado la existencia de un efecto radioprotector y antioxidante del extracto de *Crataegus Linn* en contra de los desórdenes bioquímicos inducidos por la radiación-γ en ratas (El-Azime y Ossman, 2013) y un efecto regulatorio de las funciones gastrointestinales mediante la reducción de la contractilidad del músculo liso del estómago y el intestino de ratas (Huang *et al.*, 2009). En otras pruebas, se encontró incluso una reducción de los efectos indeseables sobre el sistema digestivo de los tratamientos con azitromicina en niños (Yang *et al.*, 2010).

Los extractos alcohólicos de *Crataegus* también exhiben propiedades antiinflamatorias, previniendo la síntesis de promotores del proceso inflamatorio como histamina, serina proteasas, prostaglandinas, leucotrienos, entre otros, así como inhibiendo la escisión enzimática provocada por enzimas secretadas por los leucocitos durante la inflamación (USDA, 2006).

El uso de extractos estandarizados de *Crataegus* ha demostrado además ser seguro y tener efectos secundarios mínimos cuando se administra en las dosis recomendadas. No se observaron cambios en el estado de la sangre, enzimas hepáticas, electrolitos, glucosa o en la tasa de sedimentación de eritrocitos en un estudio realizado en humanos donde se trataron 136 pacientes con 160 mg por dosis del extracto estandarizado WS 1442 (Weikl *et al.*, 1996). Sin embargo, las

dosis altas aumentan el riesgo de hipotensión y de un efecto sedante. Por esta razón y debido a sus efectos sobre el tono y la motilidad muscular uterina, no se recomienda que sea administrado durante el embarazo (Verma *et al.*, 2007).

Los síntomas generales de toxicidad aguda observados en modelos animales han sido documentados como bradicardia y depresión respiratoria, pudiendo llegar a suceder un paro cardíaco o una parálisis respiratoria (Verma *et al.*, 2007).

#### 2.1.4 Extractos estandarizados de *Crataegus*

El uso de extractos de *Crataegus* como terapia alternativa en enfermedades cardiovasculares ha llevado a la necesidad de un estricto control de la calidad de las preparaciones medicinales utilizadas para este propósito.

Por varios años, han estado ya disponibles revisiones de distintos extractos estandarizados de *Crataegus* por parte de las autoridades reguladoras en Alemania y de la Cooperativa Científica Europea en Fitoterapia (ESCOP por sus siglas en inglés) (Tauchert, 2001) de entre los que se pueden destacar los extractos LI 132 y WS 1442 por ser los más mencionados en pruebas clínicas y Crataegisan®, por ser un extracto estandarizado obtenido de los frutos (Degenring, *et al.*, 2003).

El extracto etanólico WS 1442 se encuentra estandarizado a una concentración de 18.75%, siendo los compuestos marcadores las procianidinas oligoméricas mientras que para el extracto metanólico LI 132 los marcadores son flavonoides, en una concentración de 2.25% (Daniele *et al.*, 2006). Ambos extractos son obtenidos de flores y hojas de *C. monogyna* y *C. oxyacantha* respectivamente.

#### 2.2 *Crataegus gracilior* Phipps

En México, de acuerdo con los estudios de Eggleston (1909) y Phipps (2007) existen reportadas quince especies del género *Crataegus* y se encuentran distribuidas en las principales zonas montañosas del país que son la Sierra Madre Oriental, la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre del Sur, así como el Eje Neovolcánico Transversal como se observa en la Figura 4 (Núñez-Colín *et al.*, 2008b).

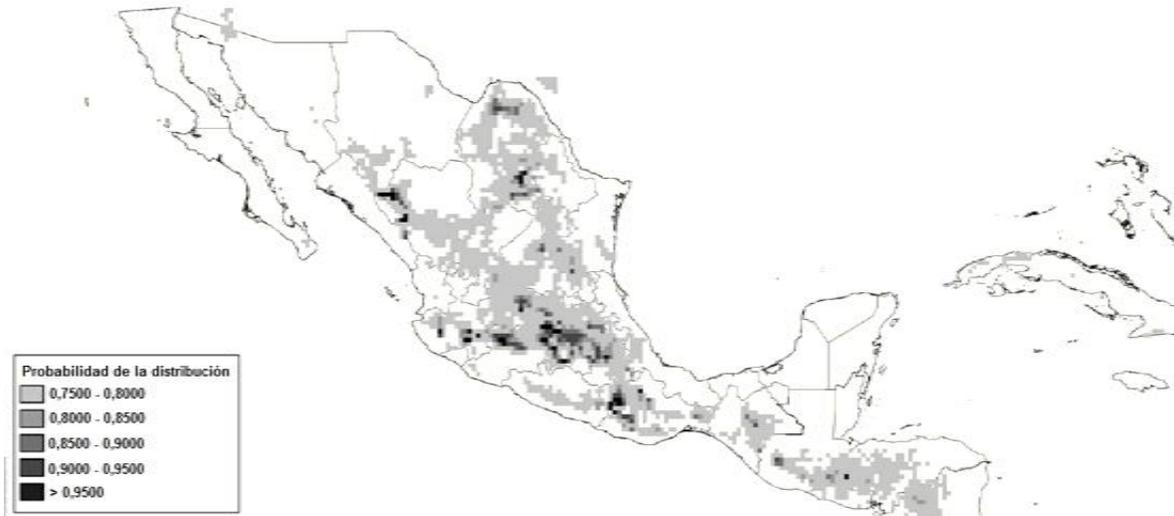


Figura 4. Distribución de *Crataegus* en México, estimada a partir de un Análisis de Información Geográfica (Núñez-Colín *et al.*, 2008b).

La especie *C. mexicana* Moc. & Sessé existe de manera restringida en México y América Central (con puntos atípicos en Perú y Ecuador). *C. uniflora* Muench., *C. greggiana* Eggl. y *C. tracyi* Ashe ex Eggl., también existen en Estados Unidos y las once especies restantes, *C. stipulosa*, *C. nelsoni*, *C. gracilior*, *C. rosei* Eggl., *C. aurescens* Phipps, *C. serratissima* Phipps, *C. sulfúrea* Phipps, *C. grandifolia* Phipps, *C. baroussana* Eggl., *C. cuprina* Phipps y *C. johnstonii* Phipps son endémicas del norte y centro de México, existiendo la propuesta de dos nuevas especies para la zona sur (Núñez-Colín *et al.*, 2008a).

*Crataegus gracilior* es entonces una especie endémica de México que por sus caracteres morfológicos tan similares, puede confundirse con *C. mexicana* e incluso a ambas se les considera especies de germoplasma superior desde el punto de vista frutícola (Núñez-Colín *et al.*, 2008b). Sin embargo, los especímenes pueden identificarse según su lugar de origen ya que la distribución geográfica de ambas especies es distinta. *C. gracilior* se puede encontrar en la Sierra Madre Oriental principalmente en la zona serrana de Querétaro como se indica en la Figura 5 (Rzedowski y Calderón-de-Rzedowski, 2005).

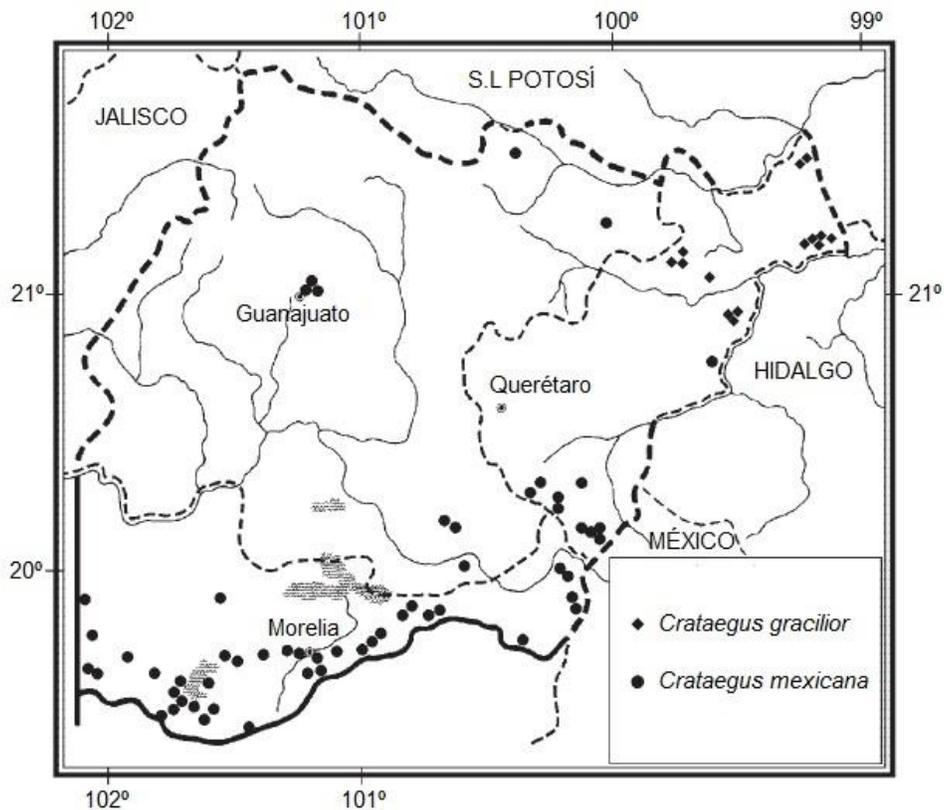


Figura 5. Distribución conocida de *C. gracilior* y *C. mexicana* en el Bajío y zonas adyacentes (adaptada de Rzedowski y Calderón-de-Rzedowski, 2005).

Actualmente, sólo existen dos estudios químicos que involucran a *Crataegus gracilior*. En el primero, se analizaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) extractos metanólicos y acuosos, encontrándose en muestras de hojas y frutos al ácido clorogénico y los flavonoides rutina, kaempferol, (+)-catequina y quercetina (López-Corona, 2013), y en un estudio posterior, se aislaron dos triterpenos: ácido ursólico y ácido corosólico de una fracción polar del extracto metanólico foliar que demostró tener un efecto vasorrelajante significativo (Hernández-Pérez *et al.*, 2014).

### 2.3 Impacto social de las enfermedades cardiovasculares

Como se ha expuesto ya, muchas especies del género *Crataegus* han demostrado ser útiles en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, lo que resulta de

especial importancia cuando se conoce el impacto que éstas tienen en la sociedad actual.

El término enfermedades cardiovasculares (ECV) se aplica a un conjunto de trastornos del corazón y los vasos sanguíneos que afecta seriamente a la población. Actualmente, son la primera causa de defunción a nivel mundial y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud para el 2030 esta causa provocará 23.3 millones de decesos anuales (OMS, 2014). En México 105 mil 962 personas fallecieron debido a alguna enfermedad del corazón en el 2012 (INEGI, 2014).

La urbanización, industrialización y la globalización que acompañan a la transición económica de los países en vías de desarrollo, traen consigo cambios en el modo de vida de sus habitantes que propician la ocurrencia de las ECV. En estos países, la esperanza de vida está aumentando de forma muy pronunciada y las personas se ven expuestas a los factores de riesgo durante períodos más largos, lo que se traduce en una mayor incidencia de ECV en la población (OMS, 2014).

La atención clínica de las ECV es costosa y prolongada. Además, estas enfermedades afectan a las personas en plena madurez, lo que tiene consecuencias económicas desfavorables en las familias y las sociedades al privarlas de valiosos recursos humanos en sus años más productivos. En los países desarrollados, los grupos socioeconómicos más bajos registran una mayor prevalencia de factores de riesgo, una incidencia más alta de enfermedades y una mortalidad mayor. En los países en desarrollo, a medida que la epidemia de las enfermedades cardiovasculares se vaya asentando, la carga se desplazará hacia los grupos socioeconómicos más desfavorecidos (OMS, 2014).

#### 2.4 Técnicas de análisis fitoquímico

Aunque hay hallazgos de la actividad farmacológica de los metabolitos secundarios aislados de especies de *Crataegus*, la mayoría de los estudios demuestran que los efectos que tienen los extractos de estas plantas sobre el sistema cardiovascular, se deben no sólo a la presencia de más de un

componente cardioactivo (Long *et al.*, 2006) sino a un sinergismo entre ellos. Este hecho no es sorprendente, pues es bien sabido que los extractos de productos naturales son en la mayoría de los casos, mezclas muy complejas de compuestos que difieren en sus características físicas y químicas, pudiendo encontrarse ácidos, bases, compuestos lipofílicos, hidrofílicos o anfífilos (Sarker *et al.*, 2006) que interactúan entre ellos y con la matriz vegetal.

La tendencia actual está entonces dirigida a una visión holística de los sistemas, lo que hace esencial identificar y determinar la abundancia de todos los constituyentes de las plantas de importancia medicinal para asegurar la repetibilidad y reproducibilidad de los análisis clínicos e implementar un control de la calidad desde la perspectiva farmacológica. Sin embargo, la complejidad y variabilidad inherente a los extractos botánicos presenta retos significativos para lograr la detección y separación de los metabolitos, que deben sortearse de manera que se pueda llevar a cabo un análisis eficiente de la composición de las plantas medicinales (Marston y Hostettmann., 2009).

Las principales técnicas analíticas que se usan en la investigación de plantas medicinales actualmente permiten obtener distintos tipos de información relativa a la composición química de las muestras. Existen métodos y técnicas de análisis que por su eficiencia prevalecen desde hace décadas, así como también hay una gran cantidad de nuevas técnicas que permiten obtener resultados con mayor especificidad y sensibilidad. Por esta razón, se expone en esta sección una breve discusión de las técnicas analíticas propuestas para alcanzar el objetivo de este proyecto.

#### 2.4.1 Cromatografía

Las técnicas cromatográficas para análisis, separación y purificación de constituyentes químicos han evolucionado en las tres últimas décadas. La eficiencia de una separación depende del manejo de dos variables: la fase estacionaria y la fase móvil, que se eligen según la naturaleza química, conocida o estimada, de los compuestos que se busca separar (Gehrke *et al.*, 2001). En el análisis de metabolitos secundarios de plantas, las fases estacionarias más

comúnmente utilizadas son de estado sólido y consisten principalmente en un material de adsorción como el gel de sílice. La necesidad de purificar compuestos polares condujo a la implementación de fases de gel de sílice modificado con grupos hidrofóbicos lo que provoca la inversión de su polaridad, razón por la cual algunas de esas fases se conocen como "reversas" (Sarker *et al.*, 2006)

Las técnicas de mayor relevancia para separar mezclas complejas, como lo son los extractos de productos naturales, van desde la cromatografía en capa fina hasta el uso de los instrumentos más modernos de cromatografía de líquidos de alta resolución, que con frecuencia están acoplados a instrumentos de detección muy sensibles. A continuación se describen brevemente las técnicas de cromatografía de las que se pretende hacer uso en el presente proyecto.

#### 2.4.1.1 Cromatografía en columna abierta

Con base en los principios ya expuestos de la separación cromatográfica por adsorción, se presenta esta técnica como la primera opción para la separación de metabolitos secundarios del extracto vegetal. La cromatografía en columna abierta (CC) consiste en hacer pasar por gravedad a la fase móvil, generalmente utilizando un gradiente de polaridad, a través de una columna de vidrio en posición vertical que se encuentra empacada con la fase estacionaria (normal o reversa), habiendo colocado la muestra en la parte superior y permitiendo de esta manera, la elución controlada de los compuestos en la muestra. Estos compuestos pueden recolectarse al terminar su paso por la columna lo que permite la obtención de distintas fracciones de complejidad menor a la original.

Las fracciones obtenidas pueden someterse a subsecuentes procedimientos de CC con la finalidad de disminuir al máximo su complejidad. De este modo, la cromatografía en columna abierta generalmente precede a la cromatografía planar o a la cromatografía de líquidos de alta resolución en los métodos de aislamiento de productos naturales.

#### 2.4.1.2 Cromatografía planar

La cromatografía planar tiene base en la separación de mezclas de compuestos orgánicos en capas delgadas de adsorbentes que se encuentran en la mayoría de los casos cubriendo una hoja de plástico, aluminio o vidrio.

La forma más usada de cromatografía planar es la Cromatografía en Capa Fina (CCF), esto debido a que es un método fácil, asequible, rápido y ampliamente utilizado para el análisis y aislamiento de productos naturales y sintéticos.

La separación en la CCF se lleva a cabo colocando la muestra en forma de un pequeño punto o una fina línea sobre el adsorbente que cubre la hoja. Existen placas para CCF analítica disponibles en el mercado. La placa es entonces colocada dentro de un tanque con el solvente adecuado y necesario sólo para empapar la orilla inferior de la placa sin llegar a cubrir el punto en el que se colocó la muestra (origen). El solvente entonces migra hacia la parte superior de la placa por acción capilar, arrastrando en diferente medida, según su afinidad con la fase estacionaria, a los compuestos químicos presentes en la muestra. La CCF permite de esta manera, la separación de los compuestos en una mezcla compleja con fines de análisis cualitativo, cuantitativo e incluso preparativo (Sarker *et al.*, 2006).

#### 2.4.1.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución y espectrometría de masas

Debido a la compleja composición que pueden tener las muestras vegetales y la baja abundancia en que suelen presentarse, el análisis de los metabolitos secundarios de plantas no es una tarea sencilla, sino que requiere de técnicas muy selectivas y sensibles. Por esa razón, suelen utilizarse en el análisis técnicas cromatográficas o electroforéticas combinadas con distintos detectores.

Debido a los volúmenes extremadamente pequeños de muestra, la electroforesis capilar presenta problemas de sensibilidad y la cromatografía de gases sí es una herramienta poderosa, pero solamente para constituyentes volátiles. En este sentido, la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC, por sus siglas en inglés) es la técnica de preparación preferida en el análisis de productos

naturales. El tipo de detector usado, que puede ir desde uno de arreglo de fotodiodos, UV-Vis, de fluorescencia hasta detección por espectrometría de masas (EM), depende de los analitos que se investigan. En contraste con las técnicas mencionadas, el uso de la EM además de presentar excelente sensibilidad permite identificar o confirmar las estructuras químicas de los metabolitos, por lo que no es sorprendente que el uso de CLAR-EM se haya incrementado para el análisis de constituyentes de plantas en los últimos años (Steinmann y Ganzera, 2011).

#### 2.4.2 Resonancia Magnética Nuclear

Cualquier molécula que contiene uno o más átomos con un momento magnético diferente de cero es potencialmente detectable por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), y debido a que entre los isótopos con momento magnético diferente de cero se incluyen el  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ , y el  $^{31}\text{P}$ , todas las moléculas de importancia biológica presentan al menos una señal en RMN. Estas señales se caracterizan por su desplazamiento químico, intensidad, estructura fina y sus propiedades de relajación magnética, características que en conjunto representan el ambiente preciso del núcleo detectado. De esta manera, los espectros de RMN entregan una gran cantidad de información acerca de la identidad estructural de las moléculas presentes en la muestra y es en este sentido, que la RMN puede utilizarse para identificar y cuantificar metabolitos en muestras de origen biológico (Krishnan *et al.*, 2005).

Se puede exhibir la utilidad de la RMN como una herramienta para el análisis de metabolitos, con dos principios. El primero, es que la RMN es una técnica no destructiva, y los espectros pueden obtenerse de suspensiones celulares, tejidos e incluso plantas completas, así como de extractos y metabolitos purificados (Ratcliffe y Shachar-Hill, 2001). Segundo, la RMN ofrece una variedad de arreglos en el esquema de detección, que puede diseñarse con base en la naturaleza de la muestra y el problema metabólico que se plantea, por lo que analizar los componentes metabólicos del extracto de un tejido, determinar la estructura de un metabolito novedoso, demostrar la existencia de una ruta metabólica particular *in vivo* y localizar la distribución de un metabolito en un tejido son todas actividades

posibles por RMN. Aunque, vale la pena mencionar que la naturaleza de las mediciones de RMN que se requieren para lograr estas tareas, en especial con relación a los requerimientos de hardware, el esquema de detección y la sensibilidad del análisis, son muy diferentes (Ratcliffe *et al.*, 2001).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado en múltiples investigaciones que las plantas del género *Crataegus* tienen una composición química compleja que exhibe distintos efectos favorables en los organismos, en especial sobre el sistema cardiovascular y que pueden ser útiles en la prevención y tratamiento de distintas enfermedades. A pesar de esto, solamente una limitada cantidad de especies ha sido descrita, lo que se refleja en que existan pocas investigaciones que permitan caracterizarlas desde un punto de vista químico y por lo tanto, que no se aproveche su gran potencial farmacológico. Las investigaciones existentes a la fecha se refieren únicamente a especies nativas de Asia y Europa en donde estas plantas son ya ampliamente utilizadas en preparaciones medicinales como el principal tratamiento alternativo para las enfermedades cardiovasculares.

En México, se pueden encontrar varias especies de *Crataegus*, y aunque su distribución geográfica es generalizada, el recurso es actualmente aprovechado como una fuente de alimento y no ha sido realmente estudiado, por lo que se desconoce su composición química y su viabilidad como agente terapéutico.

El conocimiento de la constitución química de especies que han demostrado tener utilidad en el tratamiento de enfermedades es el primer paso en el desarrollo de medicamentos y terapias dirigidos a combatirlas, por lo que es fundamental ampliar este conocimiento mediante la aplicación de técnicas analíticas precisas y repetibles de modo que puedan comprobarse sus efectos reales y utilizarse de manera segura y estandarizada ya sea en forma de fitomedicamentos o como fuentes de candidatos a fármacos.

Siendo *Crataegus gracilior* un recurso mexicano de fácil acceso y con un enorme potencial farmacológico, su estudio resulta indispensable, con el fin de generar el conocimiento necesario para permitir su aprovechamiento en la lucha contra las enfermedades cardiovasculares que afectan a la población y favorecer el

enriquecimiento de la información actual disponible del género e incluso para indicar una pauta de diferenciación taxonómica de la especie.

Hasta ahora, sólo se ha identificado un número reducido de constituyentes químicos de esta especie en los extractos polares, los cuales incluyen algunos compuestos fenólicos (López-Corona, 2013) y dos triterpenos en una de las fracciones vasorrelajantes del extracto foliar (Hernández-Pérez, 2014). Sin embargo, la fracción que demostró tener el efecto vasorrelajante más eficaz en ensayos sobre aorta aislada de rata (Hernández-Pérez *et al.*, 2014), no se ha sometido a un estudio químico que permita caracterizar su constitución. Con base en las evidencias mencionadas, se realizó en el presente trabajo el estudio químico de esa fracción.

#### **4. HIPÓTESIS**

La fracción con el efecto vasorrelajante más eficaz del extracto metanólico de *Crataegus gracilior* contiene metabolitos secundarios que también están presentes en otras especies de *Crataegus* con utilidad terapéutica.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- Caracterizar químicamente los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en la fracción con el efecto vasorrelajante más eficaz, obtenida de las hojas de *Crataegus gracilior*.

### 5.2 Objetivos particulares

- Separar y purificar los constituyentes de la fracción usando métodos cromatográficos.
- Identificar mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos los constituyentes individuales de la fracción.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Obtención del material de partida

Las hojas de *Crategus gracilior* Phipps fueron recolectadas en Pinal de Amoles, Querétaro, durante noviembre de 2012. Un ejemplar de referencia (A. Cabrera 5667) fue depositado en la colección etnobotánica del Herbario de Querétaro "Jerzy Rzedowski" de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. La muestra foliar fue sometida a un proceso de secado en una estufa a 40°C y molida hasta la homogeneización en un moledor manual. Posteriormente, las hojas secas y molidas (1,62 kg) fueron extraídas mediante maceración, utilizando de manera subsecuente los disolventes hexano, diclorometano y metanol, durante 7 días cada uno para finalmente llevarlos a sequedad con presión reducida en un rotoevaporador usando temperaturas menores a 40 °C.

Del extracto metanólico (201,3 g), se pesaron 46,0 g, los cuales fueron sometidos a un fraccionamiento inicial en una columna cromatográfica abierta en fase normal, utilizando como fase móvil un gradiente de polaridad creciente formado por distintas proporciones de hexano, diclorometano, acetona y metanol. La complejidad de las fracciones obtenidas fue analizada mediante cromatografía en capa fina y las fracciones se agruparon en once de acuerdo con su similitud (F1-F11). El procedimiento se encuentra descrito con detalle en el trabajo académico realizado por Hernández-Pérez en 2014. De éstas, la fracción F9 que presentó un buen efecto vasorrelajante fue la elegida para ser analizada en este proyecto, por lo que se almacenó en refrigeración hasta el momento de su análisis.

### 6.2 Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la F9

Los componentes de la fracción F9 (23,06 g) se separaron mediante una cromatografía en columna (100 cm de largo x 7 cm de diámetro) con gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó un gradiente de polaridad creciente preparado a partir los disolventes hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol en distintas proporciones.

### 6.3 Materiales y equipos

La cromatografía en columna (CC) se realizó en columnas de vidrio que fueron empacadas manualmente con gel de sílice adquirido de Sigma-Aldrich (Fluka, tamaño de partícula: 63-200  $\mu\text{m}$ , lote: MKBH8305V).

Las pruebas de cromatografía en capa fina (CCF) a nivel analítico se realizaron sobre placas de gel de sílice marca Merck (TLC Silica Gel 60 F<sub>254</sub>, 20 x 20 cm, 200  $\mu\text{m}$ , lote: HX251260). Las separaciones en capa fina a nivel preparativo, se llevaron a cabo sobre placas de gel de sílice marca Analtech (Uniplate Silica Gel GF, 20 x 20 cm, 500  $\mu\text{m}$ , lote: 06514). Para su visualización, se hizo uso de una lámpara de UV (UVP, Upland, California, EUA) a 254 y 365 nm, así como de un revelador de sulfato de amonio y cerio (IV).

Los análisis en cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizaron con un módulo de separación Alliance 2695 y un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) modelo 2998 (Waters, Millford, Massachusetts, EUA), utilizando para la separación a nivel analítico en fase normal una columna Agilent modelo Zorbax RX-SIL (4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ ) y en fase reversa una columna Agilent modelo Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ ). Dos análisis reportados en esta tesis se realizaron sobre una columna Agilent modelo Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ ) y para diferenciarlos, se indica la fase estacionaria en cada cromatograma presentado. La separación a nivel preparativo en fase reversa se realizó con una columna Agilent modelo PrepHT XDB-C18 (21,2 x 250 mm, 5  $\mu$ ). La adquisición y el procesamiento de los datos fueron ejecutados mediante el paquete informático Empower 3 de Waters.

Todas las muestras provenientes de la recolección de fracciones cromatográficas se concentraron con ayuda de un rotoevaporador R-114 (Büchi, Flawil, Suiza) usando temperaturas menores a 40°C.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en sus modalidades  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (COrelated SpectroscopY),  $^{13}\text{C}$  y los experimentos APT (Attached Proton Test), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) y HMBC

(Heteronuclear Multiple Bond Correlation), se obtuvieron en un espectrómetro Avance 500 (Bruker, Billerica, Massachusetts, EUA) utilizando tetra metil silicio (TMS) o piridina deuterada ( $C_5D_5N$ ) como estándares internos.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Fraccionamiento y purificación

Del procedimiento de CC al que se sometió la F9 para la separación de sus constituyentes (CC-2), se obtuvieron 532 subfracciones que fueron concentradas y agrupadas en 15 fracciones (F<sub>2-1</sub>-F<sub>2-15</sub>) de acuerdo con la similitud de sus perfiles en CCF. Los rendimientos y las fases móviles principales con las que eluyó cada fracción están indicadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Fracciones obtenidas de la separación por CC (CC-2) de los componentes de la fracción F9.

<b>Subfracciones agrupadas</b>	<b>Fracción</b>	<b>Rendimiento (mg)</b>	<b>Fase móvil</b>
001-047	F <sub>2-1</sub>	37,3	Hex 85:15 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
048-089	F <sub>2-2</sub>	3,2	Hex 1:1 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
090-108	F <sub>2-3</sub>	25,8	Hex 4:6 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
109-130	F <sub>2-4</sub>	131,7	Hex 4:6 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
131-151	F <sub>2-5</sub>	170,7	Hex 3:7 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
152-189	F <sub>2-6</sub>	63,2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
190-220	F <sub>2-7</sub>	43,1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 9:1 AcOEt
221-231	F <sub>2-8</sub>	109	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 8:2 AcOEt
232-250	F <sub>2-9</sub>	37,3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 8:2 AcOEt
251-274	F <sub>2-10</sub>	359,7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 7:3 AcOEt
275-300	F <sub>2-11</sub>	819	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 6:4 AcOEt
301-325	F <sub>2-12</sub>	335	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1:1 AcOEt
326-376	F <sub>2-13</sub>	1553,2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2:3 AcOEt
377-492	F <sub>2-14</sub>	11760,17	AcOEt 9:1 MeOH
493-532	F <sub>2-15</sub>	2730,7	AcOEt 1:1 MeOH

El análisis de las fracciones obtenidas se realizó utilizando primero la técnica de CCF y posteriormente CLAR para aquellas cuyo perfil en CCF sugiriera menor complejidad, intentando obtener las mejores condiciones de separación para la obtención de compuestos puros.

Un factor adicional que resultó ser determinante en la elección de las fracciones que se analizarían fue el rendimiento. En la Tabla 1 puede observarse que los rendimientos de algunas fracciones ( $F_{2-1}$ ,  $F_{2-2}$ ,  $F_{2-3}$ ,  $F_{2-6}$ ,  $F_{2-7}$ ,  $F_{2-9}$ ) fueron menores a los 100 mg, lo cual representó una gran limitación para proseguir con su separación, por lo que se decidió continuar con el análisis de aquellas fracciones que contaban con mejores rendimientos.

La fracción  $F_{2-4}$  con un rendimiento de 131,7 mg fue analizada mediante CLAR en fase normal, usando una fase móvil de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . El perfil cromatográfico, como puede observarse en la Figura 6, mostró un pico simétrico con intensidad dominante y un tiempo de retención reducido (4,00 minutos), lo que es un buen indicador de la pureza de la muestra así como de su solubilidad en la fase móvil.

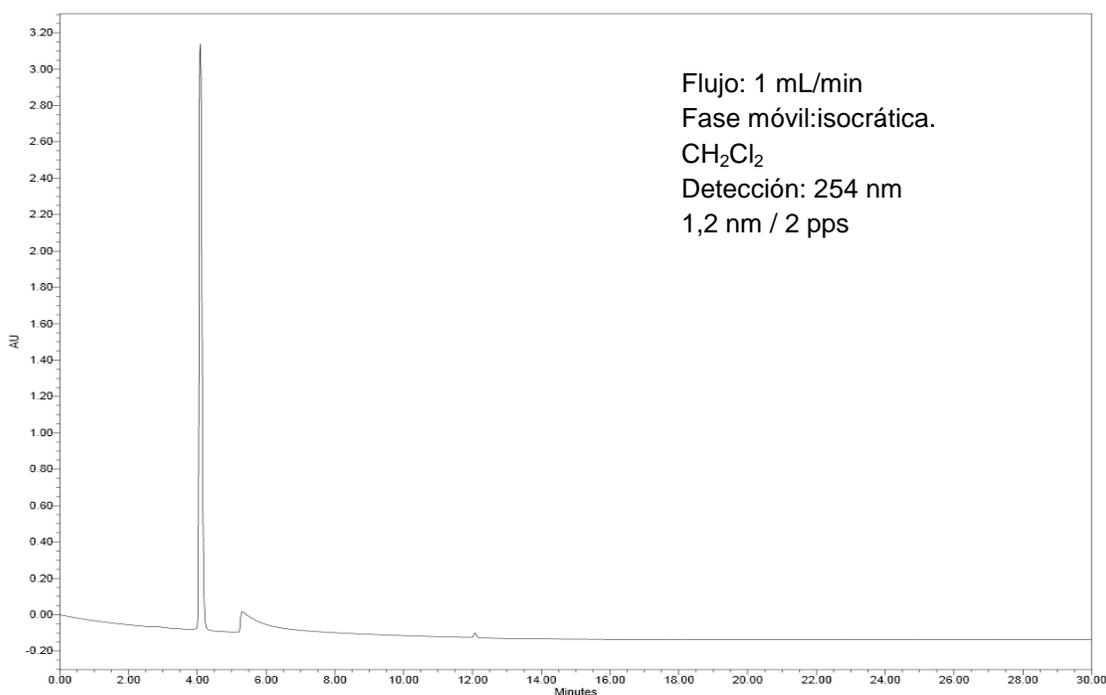


Figura 6. Cromatograma analítico de la fracción  $F_{2-4}$ .

Tomando en cuenta estas observaciones, el siguiente paso consistió en registrar los espectros de RMN. Sin embargo, el análisis de estos espectros permitió determinar que se trata de un compuesto de tipo diéster de ácido ftálico. Debido a la naturaleza de este compuesto, resulta polémica la aseveración de que se trata de un metabolito sintetizado por la planta, por lo que se decidió retomar el análisis específico de este hallazgo en un trabajo académico adicional.

El análisis por CLAR de la fracción F<sub>2-10</sub>, la cual se obtuvo con un rendimiento de 359,7 mg, también se realizó en fase normal usando como fase móvil un flujo isocrático de los solventes AcOEt y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en la proporción 40:60. El perfil, que puede observarse en la Figura 7, muestra una separación adecuada y un tiempo de retención menor a 5 minutos. Sin embargo, debido a ciertas limitaciones técnicas del equipo que impiden su uso continuo en fase normal, esta fracción no se analizó más. La muestra se almacenó a 4 °C para poder proseguir con su análisis en trabajos futuros.

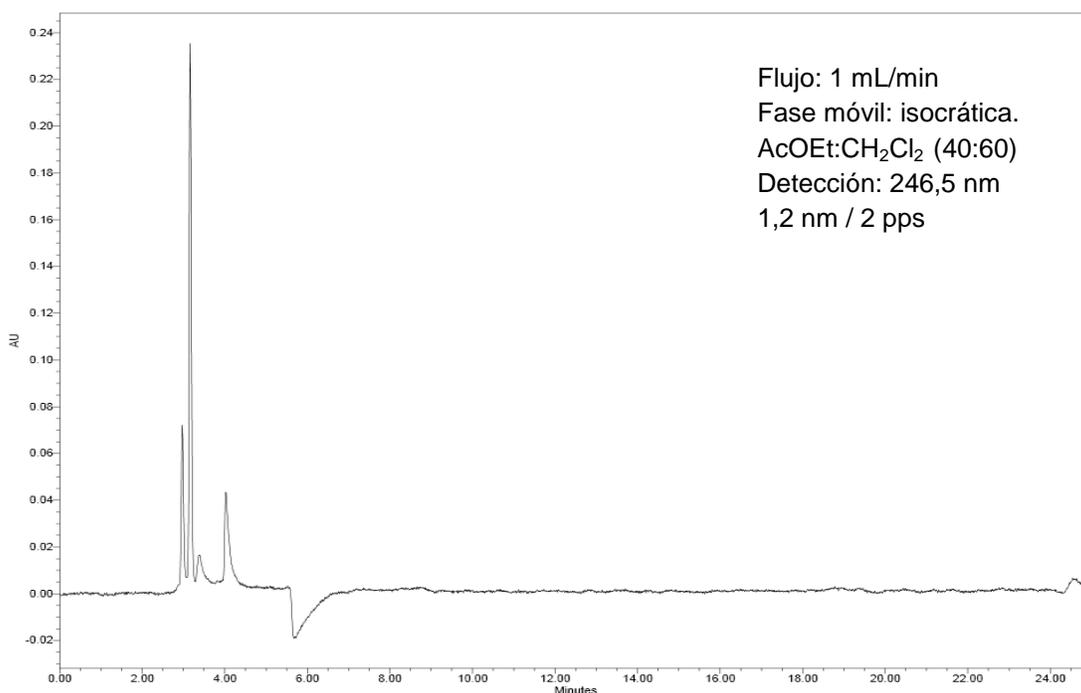


Figura 7. Cromatograma analítico de la fracción F<sub>2-10</sub>.

Durante el análisis por CLAR de la fracción F<sub>2-12</sub> (202,6 mg), se logró un ajuste de la fase móvil que permitió obtener el perfil cromatográfico ilustrado en la Figura 8. Ese perfil fue reproducible en todas las inyecciones y, a simple vista, resultó tener buena resolución, por lo que se decidió purificar los constituyentes de esta fracción mediante CLAR a nivel preparativo.

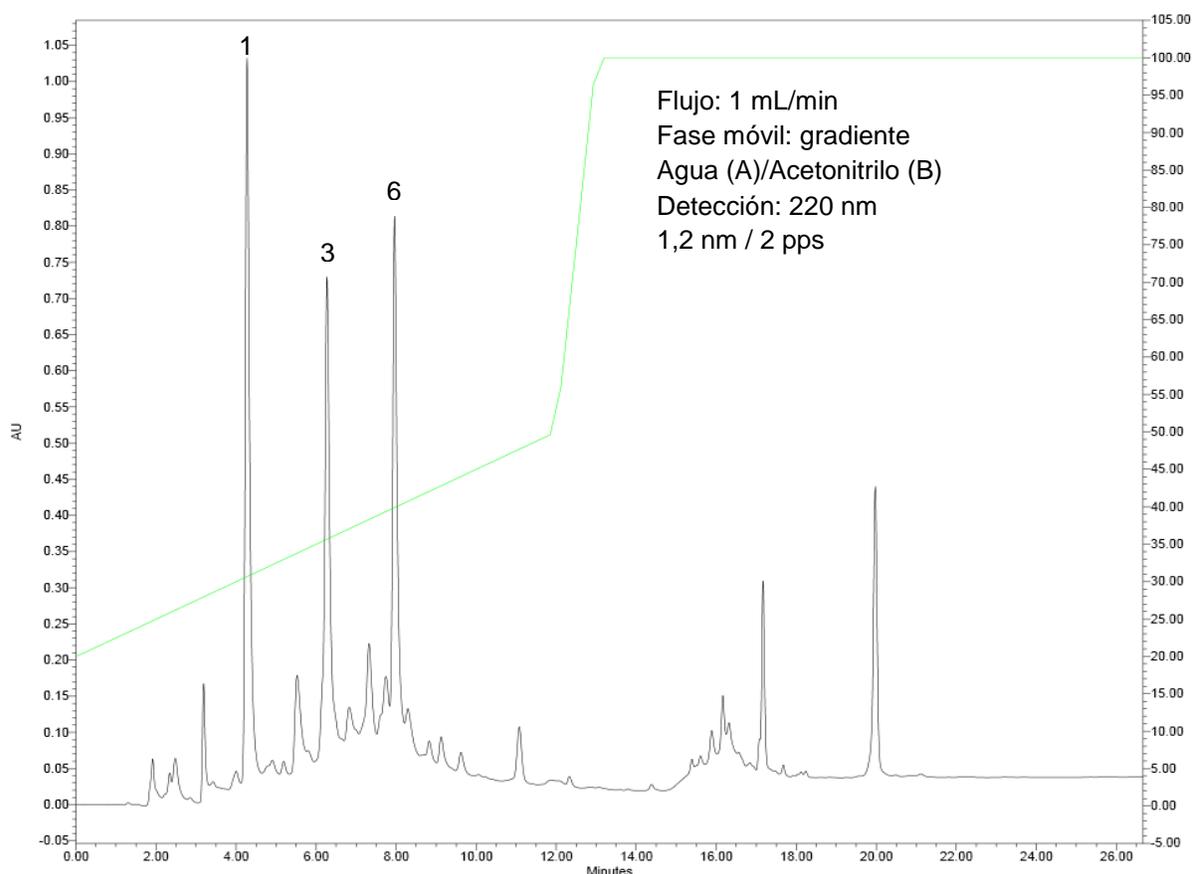


Figura 8. Cromatograma analítico de la fracción F<sub>2-12</sub>. La línea verde muestra el porcentaje de B en la fase móvil.

Con ese fin, se escaló la inyección analítica teniendo como principales retos el ajuste del gradiente en la columna de mayor diámetro y la saturación del detector, debido a que en los primeros intentos, los picos obtenidos en el cromatograma se encontraban completamente deformados por este efecto (>3,20 UA) cuando se inyectaron escasos 2,5 mg de muestra. Un análisis del espectro de absorción UV-Visible de los picos en el cromatograma, permitió observar que todos presentaban

un máximo entre 199 y 203 nm y un segundo máximo mucho menos intenso entre 277 y 280 nm (Figura 9), por lo que se decidió hacer la detección a 280 nm. Adicionalmente, se decidió reducir la resolución del detector, aumentando el ancho de banda de 1,2 a 7,2 nm y la frecuencia del muestreo de 2 a 10 pps, con la finalidad de obtener picos de menor intensidad y por lo tanto, disminuir la saturación.

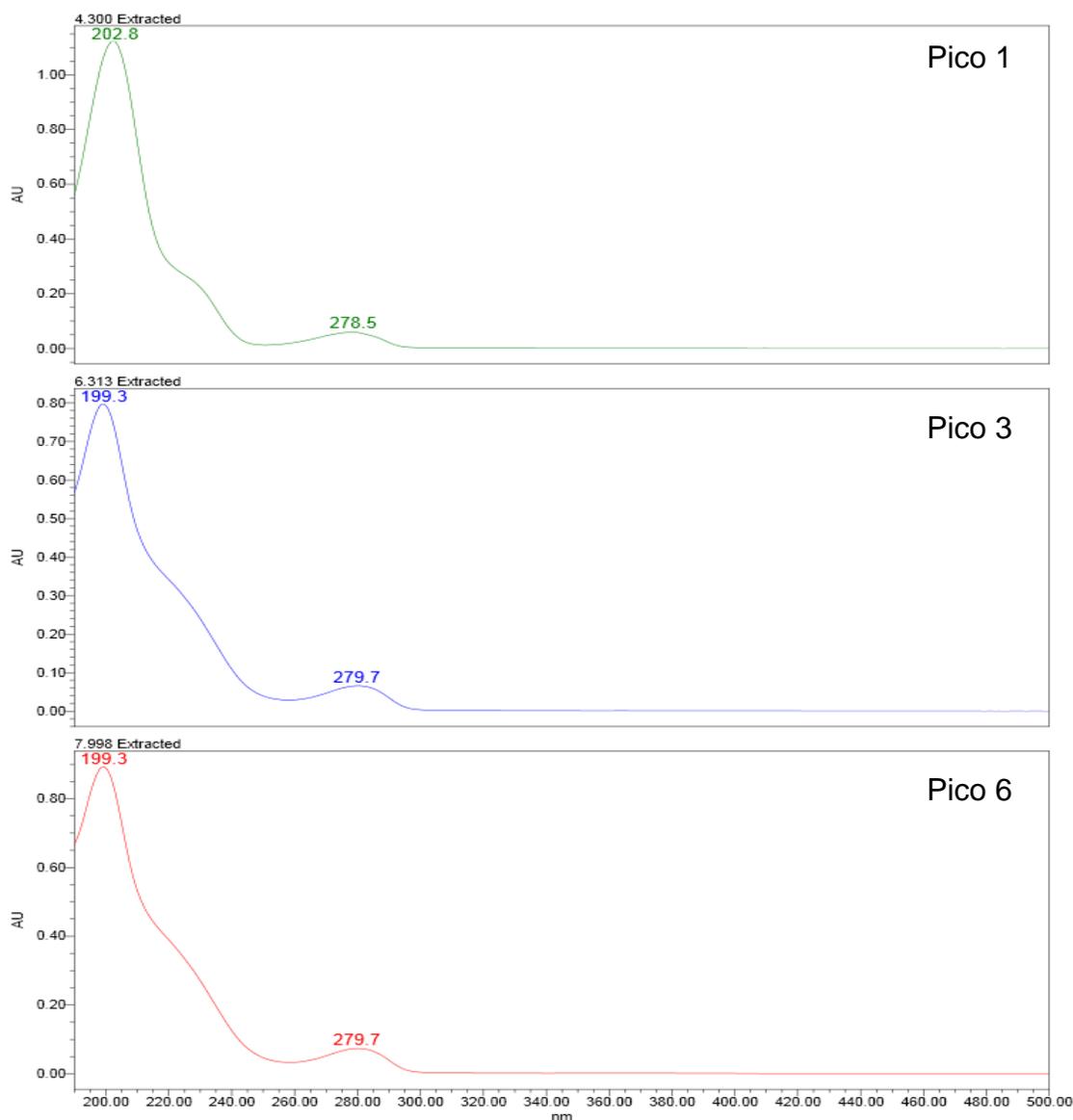


Figura 9. Espectros UV-Visible de los picos 1, 3 y 6 provenientes del cromatograma analítico de la fracción F<sub>2-12</sub>.

Las inyecciones finalmente pudieron realizarse ingresando a la columna en cada inyección hasta 20,26 mg de muestra. A pesar de la disminución de la resolución, pudieron recolectarse ocho fracciones, las cuales se encuentran indicadas con un número en la Figura 10.

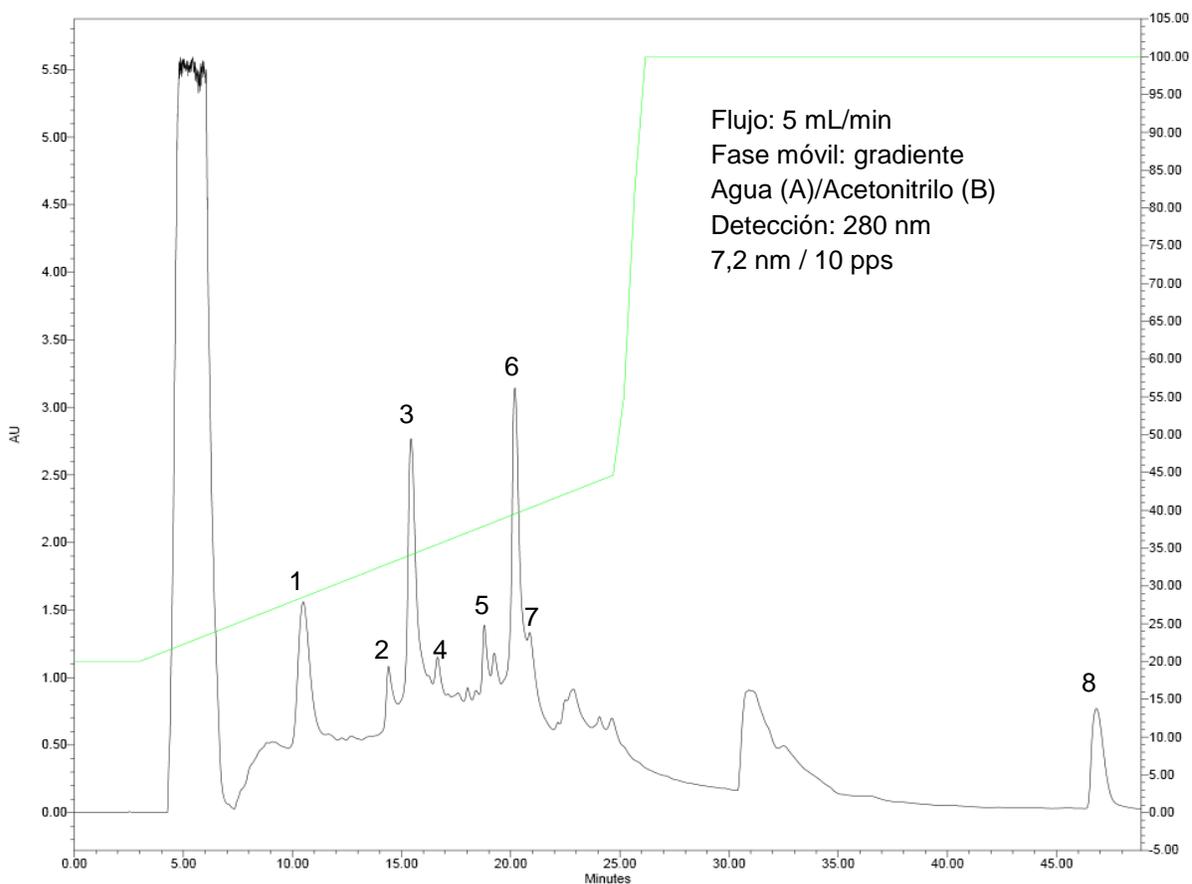


Figura 10. Cromatograma preparativo de la fracción F<sub>2-12</sub>.

Como puede observarse en la Figura 10, las fracciones 4 y 5, a diferencia de todas las demás, no coincidieron con un solo pico recolectado. En la Tabla 2 pueden observarse los rendimientos de todas las fracciones provenientes de este procedimiento. Exceptuando la 4 y la 5 por no poderse considerar puras, solamente las fracciones 1, 3 y 6 tuvieron rendimientos mayores o iguales a 8 mg, razón por la que se procedió a realizar su análisis estructural mediante el estudio de sus espectros de RMN (ver el punto 6.4.1).

Tabla 2. Fracciones recolectadas de la separación por CLAR preparativa de los componentes de F<sub>2-12</sub>.

Fracción	Tiempo de retención (min)	Rendimiento (mg)	Clave asignada para la obtención del espectro de RMN
1	10,95	8	M01 (Compuesto 1)
2	14,93	4,4	
3	16,05	8,4	M03
4	17,15	10,6	
5	18,95	11,6	
6	20,70	9,7	M06 (Compuesto 2)
7	21,9	5,3	
8	49,55	2,1	

Por otra parte, el análisis cromatográfico por CLAR de la fracción F<sub>2-13</sub> (1,3067 g) mostró un perfil muy complejo, del cual no se logró una separación adecuada; una de las mejores separaciones logradas se muestra en la Figura 11, en la que puede observarse que a pesar de someterse a un gradiente de pendiente moderada y en consecuencia, extender el tiempo de elución hasta 130 minutos, la resolución fue muy pobre. Estas observaciones y el rendimiento tan adecuado que poseía esta fracción, fueron los factores por los que se procedió a una separación en CC (CC-3).

La columna (CC-3) se empacó con gel de sílice (60 cm de largo x 5 cm de diámetro) y como eluyente se utilizó un gradiente de polaridad creciente formado por diclorometano y metanol en distintas proporciones. De este procedimiento, se obtuvieron 308 subfracciones que se agruparon en 18 fracciones de acuerdo con la similitud de sus perfiles de CCF. Los rendimientos y las fases móviles principales con las que eluyeron las fracciones obtenidas de esta columna, se encuentran en la Tabla 3.

Esta separación condujo al aislamiento del compuesto **3** puro (20,02 mg), obtenido de las subfracciones 124-126 las cuales por lo tanto no forman parte de la agrupación de subfracciones que generó la fracción F<sub>3-8</sub>.

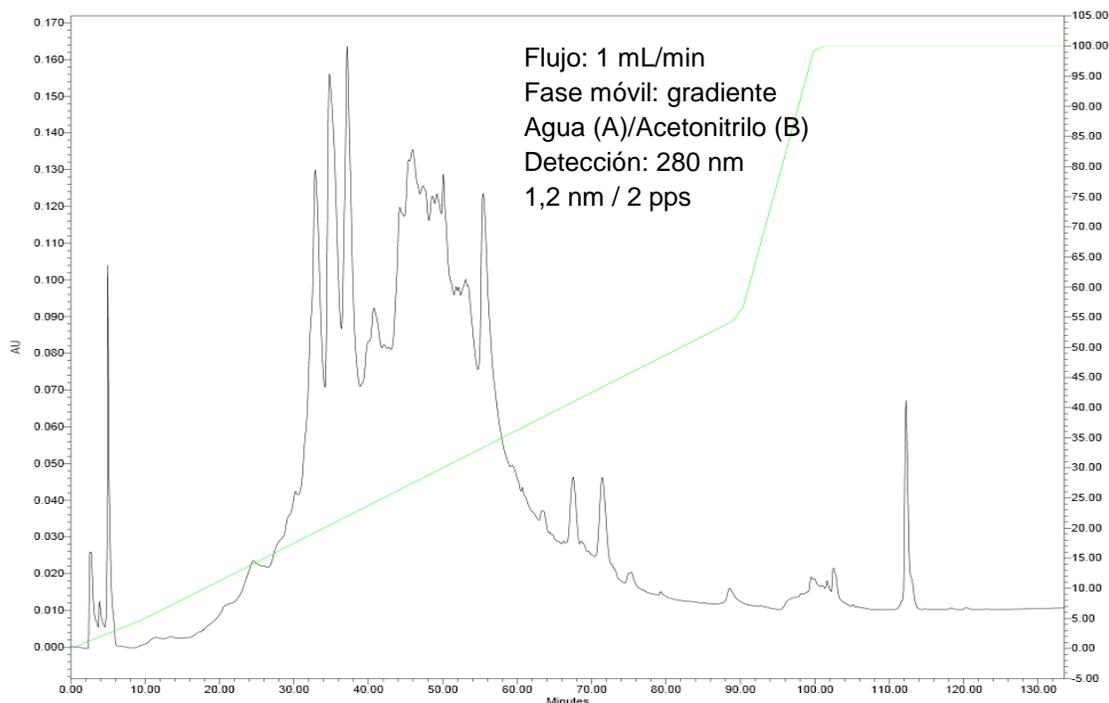


Figura 11. Cromatograma analítico de la fracción F<sub>2-13</sub>.

Se hicieron pruebas de pureza mediante CCF uni y bidimensional con distintos sistemas de elución, obteniéndose en todos los casos una única mancha, por lo que se procedió a realizar el registro de sus espectros de RMN. Las pruebas de solubilidad indicaron que el compuesto **3** no es soluble en hexano, acetona, diclorometano, acetato de etilo o metanol, sino únicamente en una mezcla 50:50 de metanol y diclorometano, por esa razón se decidió obtener los espectros solubilizando la muestra en piridina deuterada (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) (ver el punto 6.4.2).

Para el análisis de las otras fracciones obtenidas de la tercera CC, se volvió a considerar la limitación de los rendimientos; por eso, aquellas fracciones con rendimientos mayores a 100 mg fueron analizadas de manera preferente.

La fracción F<sub>3-8</sub> (109,8) que contenía las subfracciones cercanas a aquellas de las que se obtuvo el compuesto **3** se sometió a un fraccionamiento por medios físicos, precipitando con metanol en frío 10,4 mg de un polvo blanco cuyo perfil en CCF es idéntico al del compuesto **3**, por lo que se sugirió que se trataba del mismo compuesto.

Tabla 3. Fracciones obtenidas de la separación por CC (CC-3) de los componentes de la fracción F<sub>2-13</sub>.

<b>Subfracciones agrupadas</b>	<b>Fracción</b>	<b>Rendimiento (mg)</b>	<b>Fase móvil</b>
001-013	F <sub>3-1</sub>	37,5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
014-047	F <sub>3-2</sub>	22,4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
048-055	F <sub>3-3</sub>	16,7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 95:5 MeOH
056-077	F <sub>3-4</sub>	5,7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 95:5 MeOH
078-085	F <sub>3-5</sub>	2,2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 95:5 MeOH
086-105	F <sub>3-6</sub>	10,2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 95:5 MeOH
106-122	F <sub>3-7</sub>	21,9	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 90:10 MeOH
123-140*	F <sub>3-8</sub>	109,8	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 90:10 MeOH
141-148	F <sub>3-9</sub>	40,8	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 90:10 MeOH
149-165	F <sub>3-10</sub>	113,3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 90:10 MeOH
166-170	F <sub>3-11</sub>	1,2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 90:10 MeOH
171-180	F <sub>3-12</sub>	24,2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 90:10 MeOH
181-190	F <sub>3-13</sub>	46	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 90:10 MeOH
191-205	F <sub>3-14</sub>	88,7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 90:10 MeOH
206-233	F <sub>3-15</sub>	95,8	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 90:10 MeOH
234-261	F <sub>3-16</sub>	140,7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 85:15 MeOH
262-275	F <sub>3-17</sub>	259,1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1:1 MeOH
276-308	F <sub>3-18</sub>	137,7	MeOH

\*Sin incluir las fracciones 124-126

Las fracciones F<sub>3-10</sub> y F<sub>3-12</sub>, que tenían perfiles similares en CCF fueron analizadas mediante CLAR usando la columna de fase reversa C8. Los perfiles cromatográficos obtenidos muestran que su composición no era la misma.

Del análisis de la fracción F<sub>3-10</sub>, que de las dos tiene un rendimiento mayor (113,3 mg), se obtuvo un perfil cromatográfico prometedor, el cual puede observarse en la Figura 12. Hasta este momento no ha sido posible llevar la inyección a nivel

preparativo, por lo que esta fracción representa una de las perspectivas de trabajo a futuro más evidentes de este proyecto.

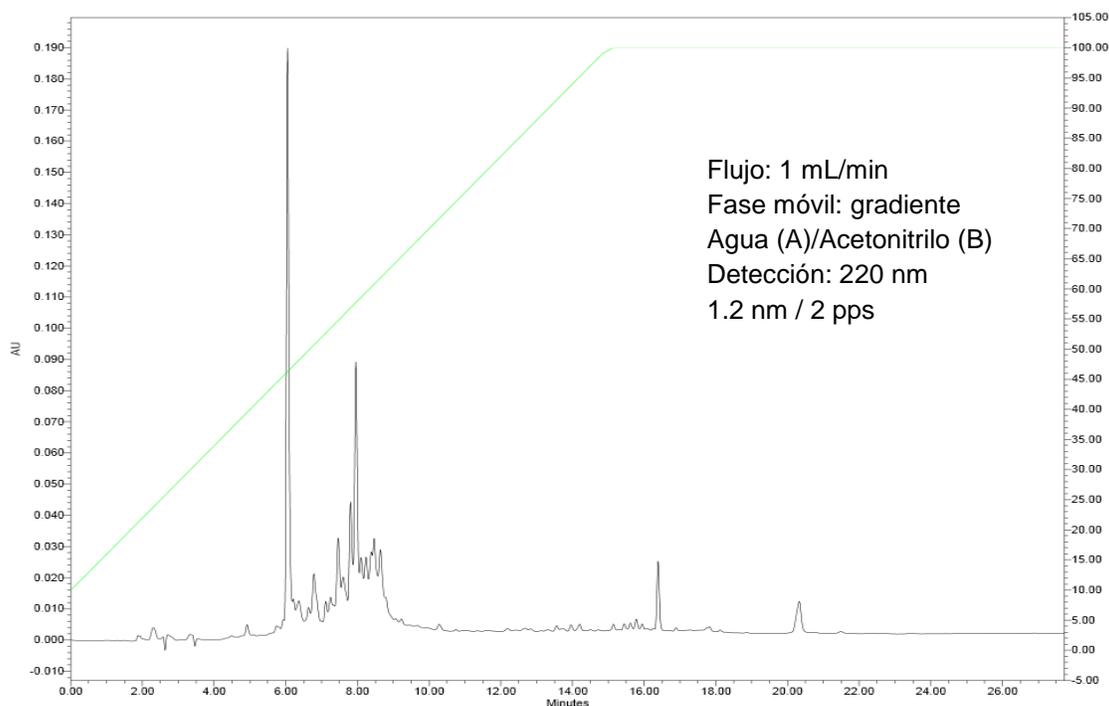


Figura 12. Cromatograma analítico de la fracción F<sub>3-10</sub>.

En contraste, la fracción F<sub>3-12</sub> que mostró un perfil no muy complejo, como puede observarse en la Figura 13, tuvo un rendimiento muy bajo (24,2 mg), haciendo inviable proseguir con la separación de sus constituyentes.

Por su parte, el análisis por CLAR de la fracción F<sub>3-16</sub> se realizó en la columna C18, obteniéndose el perfil que puede observarse en la Figura 14, tras una inyección en la que se utilizó como fase móvil un gradiente exploratorio de Agua:Acetonitrilo en el que el porcentaje del solvente menos polar varió de 0 a 100 % en 30 minutos. A pesar de que el gradiente tiene una pendiente moderada, la separación de los componentes es pobre, lo que puede observarse en la forma y la intensidad de los picos que se observan en el cromatograma. El hecho de que

esto suceda a pesar de tener un tiempo de elución prolongado, es un indicador de que la fracción  $F_{3-16}$  tiene una gran complejidad, lo que complicaría enormemente una separación de sus constituyentes por CLAR a nivel preparativo.

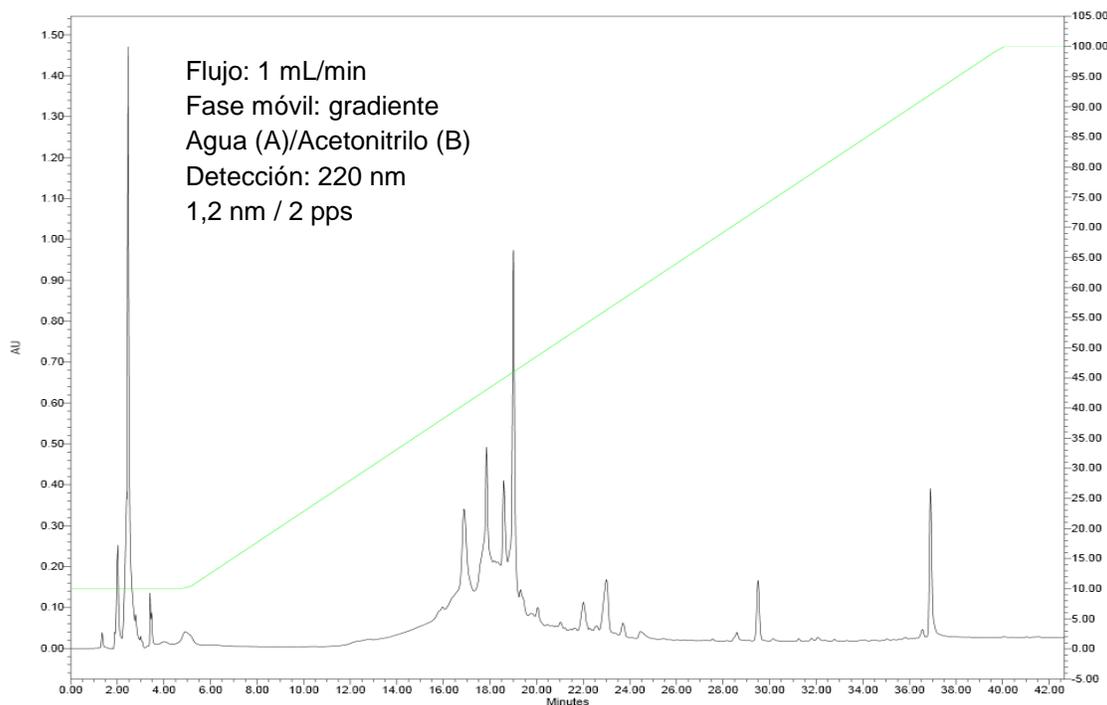


Figura 13. Cromatograma analítico de la fracción  $F_{3-12}$ .

El perfil obtenido tras el análisis por CLAR de la fracción  $F_{3-17}$ , que también se realizó en la columna C18 y que puede observarse de manera análoga en la Figura 15, muestra una situación bastante similar, por lo que para el siguiente paso en el análisis de ambas fracciones, se propone someterlas a una CC para la adecuada separación de sus componentes.

Resulta imperativo tomar en cuenta que, a pesar de tener rendimientos mayores de 100 mg, éstos pueden representar una limitación importante para una separación por ese método, por lo que el diseño de la columna (la elección de sus dimensiones, proporción de la fase estacionaria y la variación en el gradiente de elución) será una de las partes más delicadas del proceso.

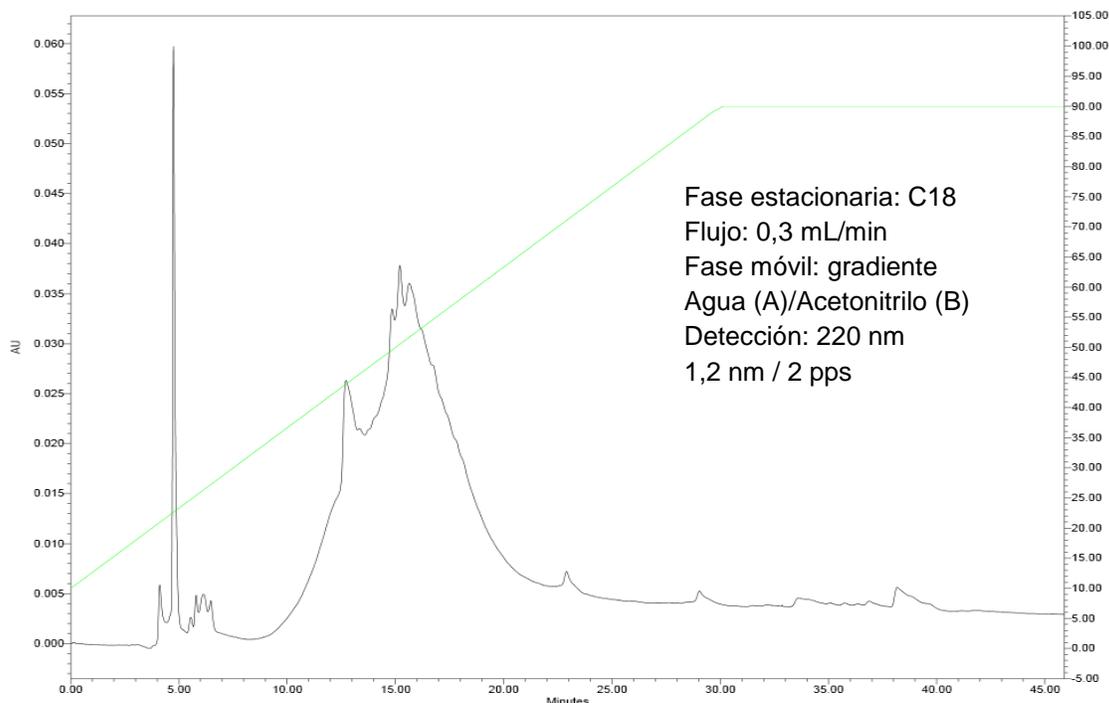


Figura 14. Cromatograma analítico de la fracción F<sub>3-16</sub>.

Cabe mencionar que en ambos cromatogramas se puede observar la presencia de algunos picos con tiempos de elución menores a 10 minutos, por lo que, otra posibilidad consiste en realizar una separación preliminar de estos picos mediante CLAR a nivel preparativo, pues al poseer tiempos de retención menores, el procedimiento podría realizarse de manera sencilla, sin desperdicio de solvente y cumpliría con la finalidad de disminuir el rango de polaridad de la fase móvil en las cromatografías en columna que se proponen.

Cronológicamente, los análisis mediante CLAR que se realizaron en primer lugar fueron los de las fracciones F<sub>3-16</sub> y F<sub>3-17</sub> y aunque la complejidad de las fracciones fue evidente, la alta presión que se desarrolló en la columna con flujos menores a 1 mL/min sugirió que su estado ya no era el ideal, lo que muy probablemente pudiera haber estado afectando la resolución de las separaciones. Por esa razón, de los análisis que fueron posteriores en el tiempo, pero que se mencionan antes en este reporte (F<sub>2-12</sub>, F<sub>2-13</sub>, F<sub>3-10</sub>, F<sub>3-12</sub>), ya solamente se presentan los que se realizaron usando la columna C8.

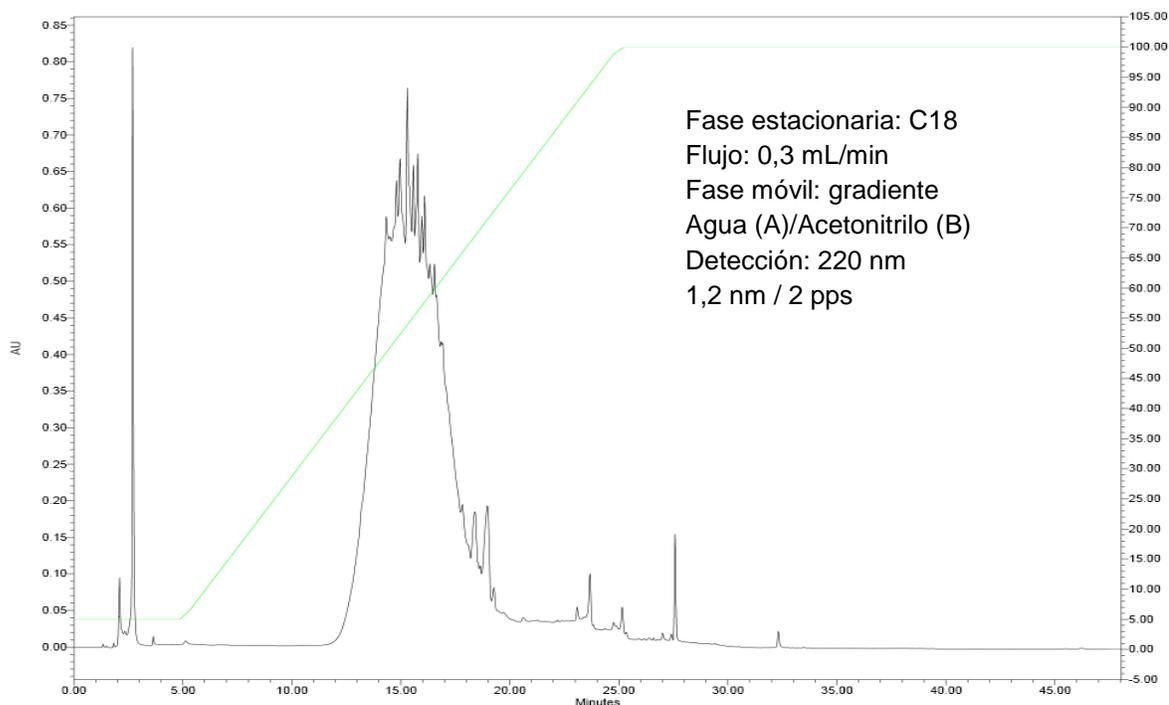


Figura 15. Cromatograma analítico de la F<sub>3-17</sub>.

## 7.2 Análisis de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear

### 7.2.1 Elucidación estructural del compuesto **1**

El compuesto **1** presentó 15 señales en el espectro de RMN de <sup>13</sup>C de las cuales doce resultaron aromáticas, entre ellas cinco posiciones oxigenadas y de las tres restantes, todas alifáticas, dos fueron oxigenadas, como puede observarse en la Figura 16. Los desplazamientos químicos de todos estos carbonos resultaron definitorios de un compuesto de tipo flavan-3-ol cuyo núcleo estructural se presenta en la Figura 17.

A cada carbono se le asignaron sus protones correspondientes utilizando las correlaciones <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C a un enlace, mediante la observación del espectro HSQC. De esta manera, la ausencia de señales en HSQC fue el principal indicador para la asignación de carbonos cuaternarios, aunque adicionalmente, esto fue corroborado para cada señal con el experimento APT.

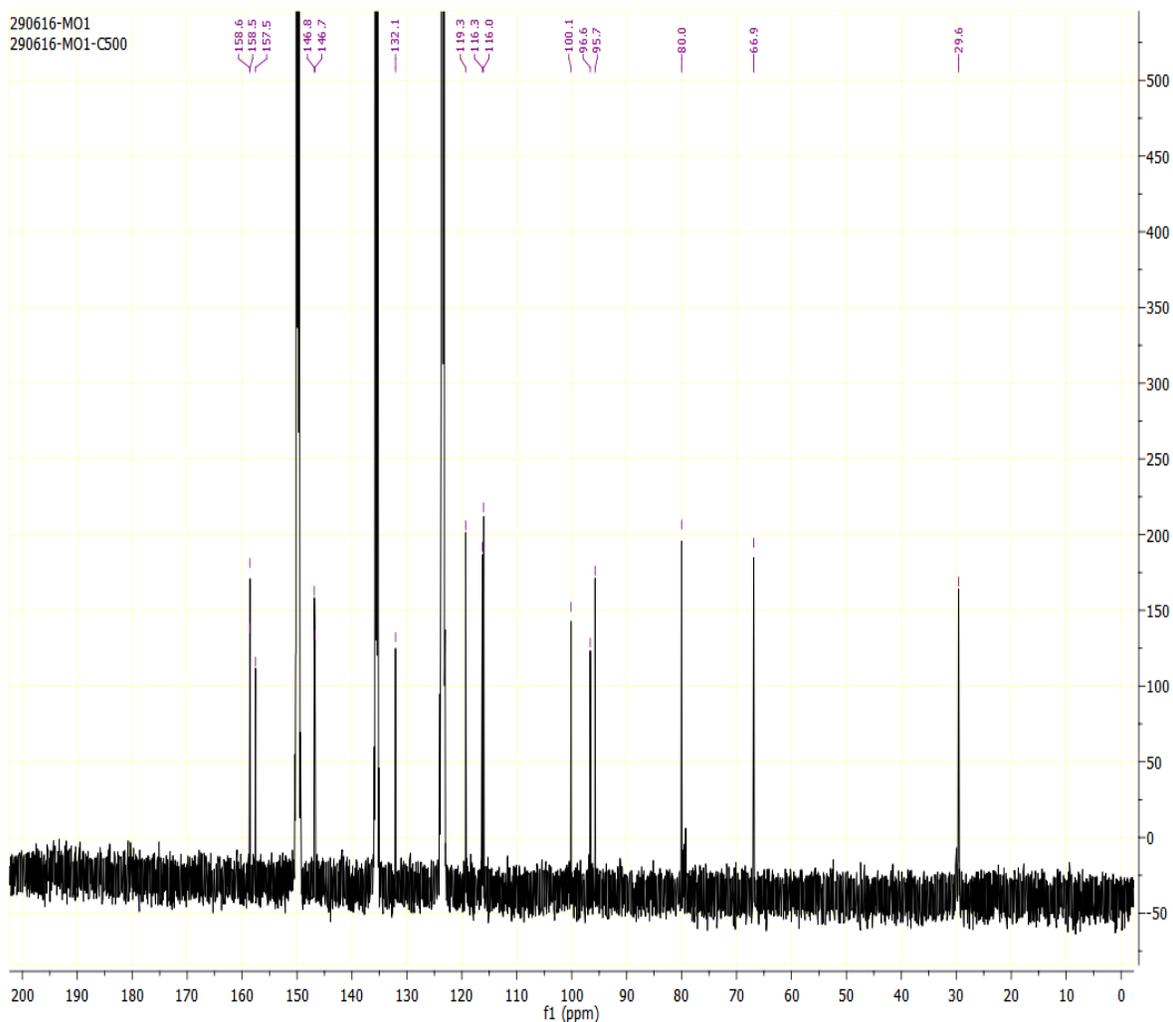


Figura 16. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **1** (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ; TMS).

Las señales de los protones en  $\delta_{\text{H}}$  3,52 (dd, 1 H) y  $\delta_{\text{H}}$  3,39 (dd, 1 H) resultaron especialmente útiles para la construcción de la estructura a partir de las evidencias espectrales. En primer lugar, el experimento HSQC permitió determinar que ambas señales son de protones unidos a un mismo carbono alifático en  $\delta_{\text{C}}$  29,6, que al ser el único metileno presente, pudo asignarse al C-4. Adicionalmente, ambas señales de esos protones muestran correlación en el espectro COSY (ver Anexo, Figura A3) con la señal de otro protón ( $\delta_{\text{H}}$  4,71, m, 1 H), que a su vez se encuentra enlazado con un carbono que tiene el desplazamiento químico característico de un carbono oxigenado ( $\delta_{\text{C}}$  66,9). Esto permitió entonces, definir estas dos señales como el H-3 y el C-3 respectivamente.

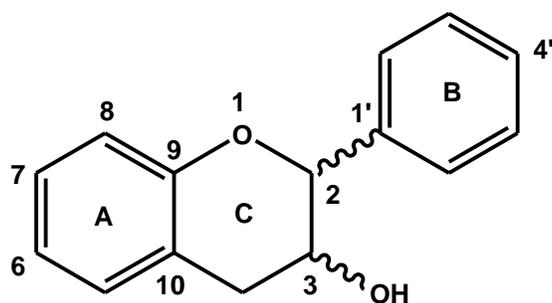


Figura 17. Estructura general de un flavan-3-ol.

El C-4 ( $\delta_C$  29,6), también presenta correlación en el HMBC con el protón en  $\delta_H$  5,34 (s, 1 H) que se encuentra enlazado con un carbono alifático unido a un oxígeno ( $\delta_C$  80,0) el cual, por su correlación en el HMBC con los protones aromáticos en  $\delta_H$  7,90 y  $\delta_H$  7,32, fue asignado al C-2. Estos protones aromáticos, que se encuentran enlazados a  $\delta_C$  116,2 y  $\delta_C$  119,3 respectivamente, pudieron entonces asignarse al anillo B, como H-5' y H-6'.

Adicionalmente, para esos protones, así como para el protón en  $\delta_H$  7,25 (enlazado con  $\delta_C$  116,0), se encontraron correlaciones en el espectro HMBC con las señales de los carbonos cuaternarios en  $\delta_C$  132,1,  $\delta_C$  146,7 y  $\delta_C$  146,8, los que en consecuencia pudieron ser definidos como C-1', C-3' y C-4', con lo que fue posible determinar en su totalidad la estructura del anillo B.

Las señales completas observadas en los espectros de RMN de  $^{13}C$  y de  $^1H$  del compuesto **1** con sus respectivos desplazamientos químicos, multiplicidades y las constantes de acoplamiento de los multipletes que forman las señales de  $^1H$ , se encuentran sintetizadas en la Tabla 4.

La señal aromática del carbono cuaternario en  $\delta_C$  157,5, cuyo desplazamiento químico coincide con el de un carbono oxigenado, presentó correlaciones en HMBC por una parte con los protones H-4<sub>a</sub> ( $\delta_H$  3,52) y H-4<sub>b</sub> ( $\delta_H$  3,39) y por otra, con el protón aromático en  $\delta_H$  6,65 (d, 1 H) enlazado con  $\delta_C$  95,7, lo que permitió designarlo como el C-9. De una manera similar, la señal cuaternaria de carbono

en  $\delta_C$  100,1 presentó correlación con los protones H-4<sub>a</sub> y H-4<sub>b</sub>; sin embargo, para este carbono también se encontró correlación de larga distancia con el protón enlazado con C-3 ( $\delta_H$  4,70, ddd, 1 H), lo que indica que esta señal corresponde al C-10.

Tabla 4. Constantes espectroscópicas del compuesto 1 (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N como disolvente y estándar interno).

<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H		
C	$\delta_C$	$\delta_H$	Multiplicidad	J (Hz)
2	80,0	5,34	s	
3	66,9	4,70	ddd	4,5, 1,7
4	29,6	3,52	dd	16,4, 3,6
		3,39	dd	16,3, 4,6
5	158,6		-	
6	96,6	6,67	d	2,2
7	158,6		-	
8	95,7	6,65	d	2,2
9	157,5		-	
10	100,1		-	
1'	132,1		-	
2'	116,0	7,25	d	8,0
3'	146,7		-	
4'	146,8		-	
5'	116,2	7,90	d	1,9
6'	119,3	7,32	dd	8,1, 1,9

La constante de acoplamiento más pequeña de la señal del protón en C-3 ( $\delta_H$  4,70, ddd,  $J = 4,5, 1,7$  Hz, 1 H) indica que los protones en C-3 y C-2 se encuentran en posición *cis*, es decir, del mismo lado con respecto al plano de la molécula.

Adicional a esto, las evidencias espectrales encontradas fueron comparadas con las señales descritas en un reporte ya publicado (Davis *et al.*, 1996), lo que permitió concluir que el compuesto **1** es la epicatequina (Figura 18).

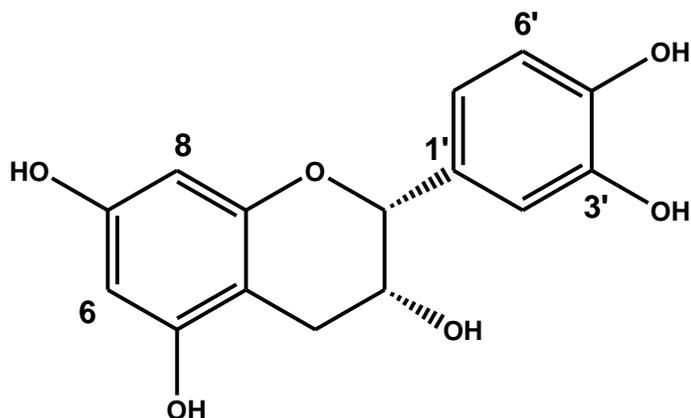


Figura 18. Estructura del compuesto **1** (epicatequina).

Se requeriría de un análisis de polarimetría para asegurar que se trata del isómero (-) de la epicatequina; sin embargo, debido a su mayor abundancia en la naturaleza, la probabilidad de que se trate de este isómero y no del (+) es mucho mayor. Vale la pena mencionar que éste es el primer reporte de la asignación completa de señales de RMN para la epicatequina que es realizado con  $C_5D_5N$  como disolvente.

#### 7.2.2 Elucidación estructural del compuesto **2**

El compuesto **2** presentó en total 24 señales en su espectro de RMN de  $^{13}C$ . Una observación minuciosa de los desplazamientos químicos de estas señales permitió descubrir que este compuesto también poseía el núcleo del tipo flavan 3-ol, lo que se comprobó con la presencia de las interacciones observadas en los espectros bidimensionales y en el APT. Como se esperaba para esta parte de la molécula, se observó claramente la presencia del metileno C-4 en  $\delta_C$  29,5 y que tiene correlación con dos protones designados como H-4<sub>a</sub> y H4-<sub>b</sub> en  $\delta_H$  3,52 (dd, 1 H) y  $\delta_H$  3,38 (dd, 1 H) respectivamente. Éstos a su vez se relacionan en el COSY con la señal del protón en  $\delta_H$  4,68 (m, 1 H), que al estar enlazado al carbono

oxigenado en  $\delta_C$  66,0, permitió que ambos fueran asignados, el primero al H-3 y el segundo al C-3.

Con esta base, se asignaron las señales de los núcleos de H y C del anillo B, observando las correlaciones en el espectro HMBC de las tres señales aromáticas de protones en  $\delta_H$  7,77, 7,08 y 7,23, designadas como H-2', H-5' y H-6' con tres carbonos aromáticos que se definieron como cuaternarios en  $\delta_C$  131,2, 146,5 y 146,6 según los espectros APT y HSQC, por lo que, de manera análoga a lo que se hizo con la epicatequina, dichos carbonos pudieron ser asignados como C-1', C-3' y C-4'.

Por otra parte, pudo encontrarse un segundo grupo de señales aromáticas que presentaron entre ellas, correlaciones en HMBC. Esta vez, a diferencia de lo encontrado para la epicatequina, se incluye una señal única de protón en  $\delta_H$  6,58 (s, 1 H) con  $\delta_C$  95,7, y cinco carbonos cuaternarios. Los desplazamientos químicos de  $\delta_C$  157,0 y 153,1 permitieron asignar estas señales al C-5 y al C-7 (ambas posiciones hidroxiladas).

Por otra parte, las correlaciones en el HMBC de los protones H-4<sub>a</sub> y H-4<sub>b</sub> indicaron que el carbono oxigenado en  $\delta_C$  147,0 corresponde al C-9 y permitieron distinguir que uno de los carbonos en  $\delta_C$  105,3 corresponde al C-10 mientras que el otro, que no las presenta, fue el C-8.

Si comparamos estas evidencias espectrales con las del compuesto **1**, resultan en parte equivalentes, lo que justifica la aseveración inicial de que la epicatequina forma parte de la estructura de esta molécula.

Las señales completas observadas en los espectros de RMN de  $^{13}C$  y de  $^1H$  del compuesto **2** con sus respectivos desplazamientos químicos, multiplicidades y las constantes de acoplamiento de los multipletes que forman las señales de  $^1H$ , se encuentran sintetizadas en la Tabla 5.

Tabla 5. Constantes espectroscópicas del compuesto **2** (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, TMS como estándar interno).

<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H			
C	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
2	80,1	5,35	s		1,00
3	66,0	4,68	m		1,00
4	29,5	3,52	dd	16,9, 2,9	1,18
		3,38	dd	16,7, 4,5	1,16
5	157,0		-		
6	95,7	6,58	s		1
7	153,1		-		
8	105,3		-		
9	147,0		-		
10	105,3		-		
1'	131,2		-		
2'	115,7	7,77	s		0,96
3'	146,5		-		
4'	146,6		-		
5'	116,5	7,08	d	8,1	1,11
6'	118,8	7,23	m*		2,01
2''	168,5		-		
3''	38,0	3,20	m*		1,96
4''	34,3	4,83	dd	5,2, 3,3	1,04
5''	115,0	7,38	d	2,12	1
6''	151,3		-		
7''	118,7	7,01	dd	8,1, 2,1	1
8''	115,8	7,23	m*		2,01
9''	145,9		-		
10''	134,3		-		

\* Señal sobrepuesta

Adicionalmente, se observó un singulete para el protón en  $\delta_H$  6,58 (s, 1H), que está enlazado al C-6, en vez de un doblete como el que se observa para el compuesto **1**, lo que revela que existe un sustituyente enlazado al C-8. Esta evidencia se complementa con el hecho de que el C-8 en  $\delta_C$  105,3 aparece como cuaternario según los espectros HSQC y APT.

Del resto de las señales, destaca la presencia de un carbonilo del tipo éster  $\delta_C$  168,5 y un metileno alifático en  $\delta_C$  38,0 con sus dos protones en  $\delta_H$  3,20 (m, 2H) que muestra correlación en el espectro COSY con un protón de metino en  $\delta_H$  4,83 (dd, 1H) que se encuentra enlazado al carbono en  $\delta_C$  34,3. Del mismo modo, destacan las correlaciones en HMBC de los protones aromáticos en  $\delta_H$  7,77 (s, 1H), 7,01 (d, 1H) y 7,23 (d, 1H) que se encuentran enlazados a los carbonos en  $\delta_C$  115,7, 118,7 y 115,8, con las señales de los carbonos cuaternarios aromáticos en  $\delta_C$  151,3, 145,9 y 134,3, evidencias que indican la presencia de un anillo aromático hidroxilado en esa parte de la molécula. Estas evidencias espectrales indican que el sustituyente es de tipo hidroxicumarina y además coinciden con las encontradas para la 6-hidroxicumarina-(4'' $\rightarrow$ 8)-(-)-epicatequina (Figura 19) en un reporte reciente (Madhu *et al.*, 2016).

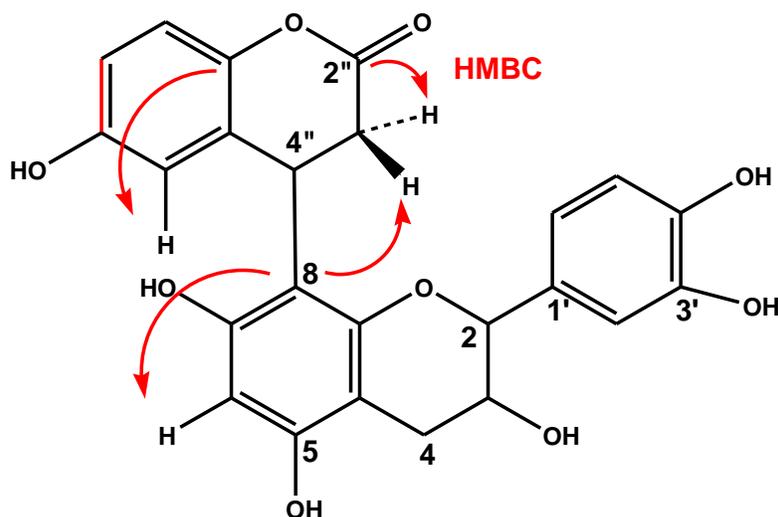


Figura 19. Estructura del compuesto **2** (6-hidroxicumarina-(4'' $\rightarrow$ 8)-(-)-epicatequina). En rojo se muestran las relaciones más importantes encontradas en HMBC.

### 7.2.3 Elucidación estructural del compuesto **3**

El análisis de los espectros de RMN bidimensional heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  modalidad HSQC y de  $^{13}\text{C}$  modalidad APT, así como de las diferentes regiones de los espectros, permitió determinar la naturaleza triterpénica del compuesto **3**, así como la presencia de una hexopiranosas. Entre las hexopiranosas más abundantes en la naturaleza, se encuentran la glucosa, la  $\beta$ -D-manosa y la  $\beta$ -D-galactosa, las cuales pueden distinguirse solamente mediante las constantes de acoplamiento ( $J$ ) de sus respectivos sistemas de spines. Así por ejemplo, la glucosa y la galactosa difieren en las configuraciones de sus centros quirales C-4, ya que para la primera hexosa dichas  $J$  se encuentran en el rango de 6 a 9 Hz, en tanto que para la  $\beta$ -D-galactosa, dicho valor se sitúa entre 2 y 3 Hz. Entre esos tres isómeros, la  $\beta$ -D-manosa es la única que muestra una  $J_{1,2}$  entre 0,5 y 1,0 Hz (Agrawal, 1992). De esta forma, la naturaleza de este azúcar fue entonces establecida mediante el cálculo de las  $J$  de todo su sistema de spin, en particular las correspondientes a los protones en C-3, C-4 y C-5, ya que dichos valores fueron propios de hidrógenos en posición relativa *trans* ( $J$  entre 6 y 9 Hz) (Tabla 6).

Para el núcleo triterpénico, se contabilizaron 29 carbonos, indicando que se trataba entonces de un hexopiranosido de un *nor*-triterpeno, para un total de 35 C para el compuesto **3**. Asimismo, combinando el análisis de las dos modalidades espectroscópicas antes mencionadas y el espectro de correlación bidimensional homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  modalidad COSY, se estableció la naturaleza de cada uno de los carbonos. De esta forma se identificaron 6 metilos, dos de los cuales fueron singuletescuyas señales se localizaron en  $\delta_{\text{H}}$  0,95 y 0,67, tres dobletes en  $\delta_{\text{H}}$  0,88, 0,89 y 1,00 y un triplete en  $\delta_{\text{H}}$  0,92. De igual forma, se estableció la presencia de 12 metilenos, uno de los cuales mostró dos hidrógenos diastereotópicos sobre un carbono oxigenado en  $\delta_{\text{H}}$  4,59 (dd,  $J = 11,8, 2,4$  Hz, 1H) y 4,44 (dd,  $J = 11,8; 5,2$  Hz, 1H), ambos sobre el C con  $\delta_{\text{C}}$  62,9. Dicho metileno se asignó evidentemente a la posición 6 de la hexosa. Los otros 11 metilenos, cuyos desplazamientos químicos se encontraron en el intervalo de  $\delta$  entre 21 y 41, fueron asignados a la

cadena triterpénica. Asimismo, se contabilizaron 14 metinos, entre ellos uno en  $\delta_C$  121,9 ( $\delta_H$  5,37, d, 5,1 Hz), que es propio de un metino vinílico. Otro metino en  $\delta_C$  5,08 ( $\delta_C$  102,6) fue asignado al centro anomérico de la hexosa, haciendo uso del experimento COSY. Dicho experimento permitió además determinar los cuatro metinos restantes del azúcar, todos bases de oxígeno. Mientras tanto, el metino en  $\delta_C$  78,2 que también es oxigenado, con  $\delta_H$  centrado en 3,96, se asignó al CH-3 del triterpeno, debido a que no tenía correlación en su espectro COSY con algún protón de la hexosa. Finalmente, los 3 carbonos restantes carecían de correlación en el HSQC con protones, por lo tanto eran cuaternarios. El carbono en  $\delta_C$  141,0 era evidentemente el segundo del grupo vinilo del triterpeno. Las constantes espectroscópicas de este compuesto se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Constantes espectroscópicas del compuesto **3** (500 MHz,  $C_5D_5N$ , TMS como estándar interno).

$^{13}C$		$^1H$		
Posición	$\delta_C$	$\delta_H$	Multiplicidad	J (Hz)
1	37,5	1,75	m*	
		1,00	m*	
2	30,3	2,14	dt	15,1
		1,76	m*	7,5
3	78,2	3,96	m	
4	39,4	2,75	ddd	13,3, 4,6, 2,1
		2,49	m*	
5	141,0	-	-	
6	122,0	5,37	d	5,1
7	32,2	1,93	m*	
		1,56	m*	
8	32,1	1,39	m*	
9	50,4	0,91	m*	
10	37,0	-		
11	21,3	1,39	m*	
		1,44	m*	

Tabla 6. (Continuación)

<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H		
Posición	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	Multiplicidad	J (Hz)
12	40,0	2,00	dt	12,6, 3,3
		1,11	m*	
13	42,5	-		
14	57,0	0,95	m*	
15	24,5	1,56	m*	
		1,04	m*	
16	28,6	1,86	m*	
		1,28	m*	
17	56,3	0,95	m*	
18	12,0	0,67	s	
19	19,5	0,95	s	
20	36,4	1,40	m*	
21	19,0	1,00	d	6,5
22	34,3	1,42	m*	
		1,10	m*	
23	26,5	1,27	m*	
24	46,0	1,00	m*	
25	29,5	1,69	m*	
26	19,3	0,88	d	6,8
27	20,0	0,89	d	6,8
28	23,5	1,30	m*	
29	12,2	0,92	t	7,4
Glu-1	102,6	5,08	d	7,7
Glu-2	75,4	4,09	dd	8,3, 8,3
Glu-3	78,7	4,33	dd	7,8,6,1
Glu-4	71,8	4,31	dd	8,1, 6,0
Glu-5	78,5	4,01	m	
Glu-6	62,2	4,59	dd	11,8, 2,4
		4,44	dd	11,8, 5,2

\* Señal sobrepuesta

Teniendo en cuenta la detección de cinco carbonos monooxygenados y el anomérico doblemente oxigenado, los análisis anteriores en su conjunto permitieron establecer la fórmula molecular  $C_{35}H_{60}O_6$  para un peso molecular de 576 Da. De dicha fórmula molecular, se determinó que la molécula tiene un grado de insaturación  $I = 6$ , uno para la hexosa, otro para el doble enlace y los cuatro restantes para el *nor*-triterpeno, lo cual solamente permite un terpenoide tetracíclico. Una búsqueda bibliográfica (ScienceFinder) arrojó en total 16 opciones para esa fórmula molecular. Dichas opciones diferían por dos rasgos estructurales principales: la configuración de los centros quirales y la posición del grupo vinilo. Este último fue determinado mediante el análisis de las correlaciones heteronucleares a varios enlaces modalidad HMBC, encontrándose que dicho enlace se encontraba en  $\Delta^{5,6}$ . Eso se estableció gracias a las correlaciones basadas en el C-5 ( $\delta_C$  141,0) (Figura 20).

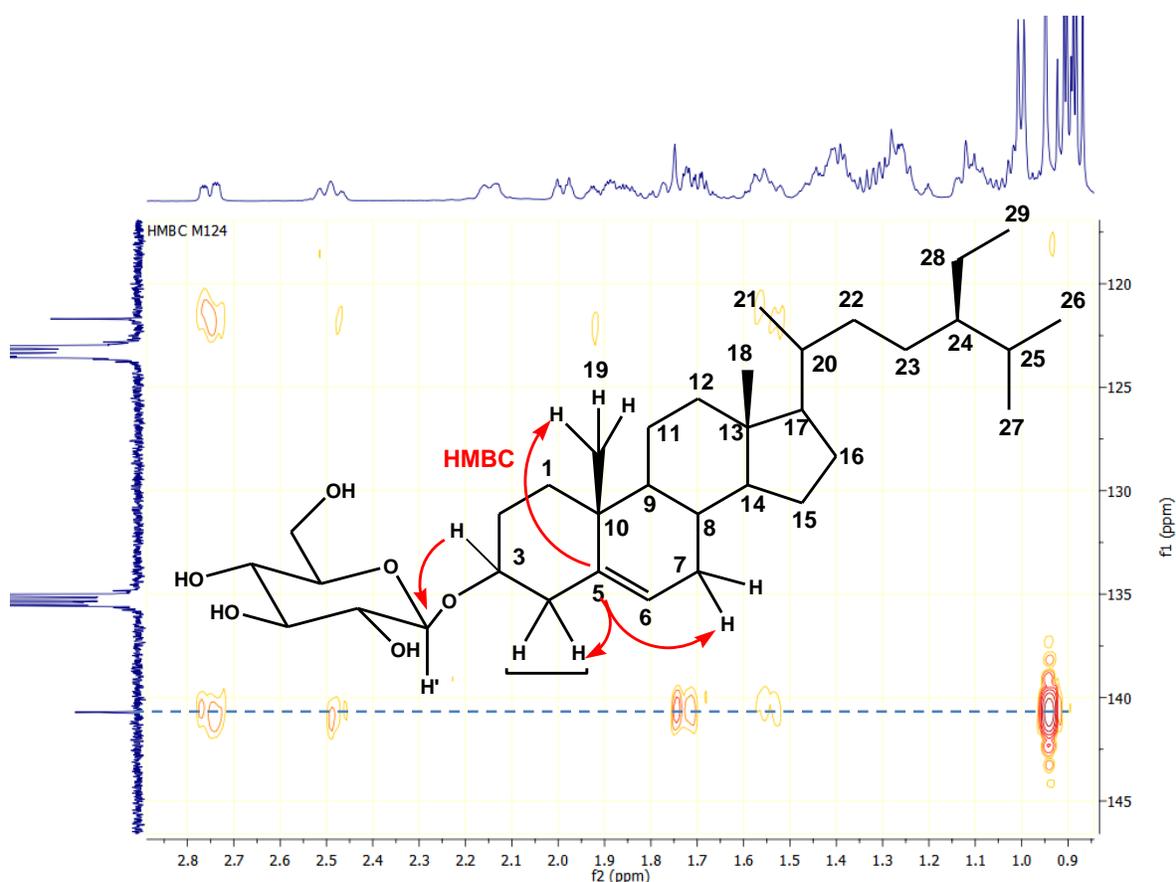


Figura 20. Estructura del compuesto **3** (daucosterol). En rojo se muestran las correlaciones más importantes encontradas en HMBC.

Finalmente, la estructura determinada fue concordante con la del daucosterol. Este compuesto fue aislado por primera vez de la planta *Prunella vulgaris* (Kojima *et al.* 1990).

## 8. CONCLUSIONES

La fracción del extracto metanólico foliar de *Crataegus gracilior* Phipps que presentó mejor efecto vasorelajante, denominada F9, tiene una gran complejidad química.

De esta fracción se logró el aislamiento de tres compuestos puros y utilizando la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear, las estructuras de estos compuestos pudieron ser elucidadas. Los compuestos se identificaron inequívocamente como epicatequina (**1**), 6-hidroxycumarina-(4"→8)-(-)-epicatequina (**2**) y daucosterol (**3**).

Aunque de la epicatequina y sus derivados, especialmente los de tipo procianidina oligomérica, ya se ha probado el efecto vasorrelajante e hipotensor, la 6-hidroxycumarina-(4"→8)-(-)-epicatequina es un compuesto que sólo ha sido encontrado en *A. cadamba* y para el cual la descripción de sus efectos farmacológicos se limita a unos pocos ensayos que ponen de manifiesto su utilidad en contra de la proliferación celular en modelos de cáncer. Por esta razón, una de las perspectivas a futuro de este trabajo es la evaluación farmacológica de este compuesto, con el objetivo de conocer su aplicación y mecanismo de acción en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

## 9. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS Y DE SEGURIDAD

En el presente trabajo se analizó una fracción obtenida a partir de un extracto foliar de *Crataegus gracilior* Phipps. Las hojas fueron recolectadas de especímenes que se encuentran en el Municipio de Pinal de Amoles, Querétaro. Aunque las plantas son silvestres, crecen en terrenos de ejidatarios de quienes se obtuvo permiso para coleccionar pequeñas muestras con la finalidad de realizar estudios en laboratorio. Los métodos de recolección de muestras y las cantidades extraídas de material vegetal no representan peligro alguno para la vida y desarrollo normal de los especímenes.

## 10. REFERENCIAS

Agrawal PK. 1992. NMR spectroscopy in the structural characterization of oligosaccharides and Glycosides. *Phytochemistry*. 31(70): 3307-3330.

Arrieta J, Siles-Barrios D, García-Sánchez J, Reyes-Trejo B, Sánchez-Mendoza ME. 2010. Relaxant effect of the extracts of *Crataegus mexicana* on guinea pig tracheal smooth muscle. *Pharmacognosy Journal*. 2(17): 40–46.

Brixius K, Willms S, Napp A, Tossios P, Ladage D, Bloch W, Mehlhorn U, Schwinger RH. 2006. *Crataegus* special extract WS 1442 induces an endothelium-dependent, NO-mediated vasorelaxation via eNOS-phosphorylation at serine 1177. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 20: 177–84.

Büechi S, Weber M. 2002. Weissdornfrüchte (*Crataegi fructus*) bei Herzinsuffizienz. *Schweizerische Medizinische Zeitschrift für Phytotherapie*. 2:5-9

Chang Q, Zuo Z, Harrison F, Sing Sum Chow M. 2002. Hawthorn. *Journal of Clinical Pharmacology*. 42:605-612.

Cuzzocrea S, Salvemini D. 2007. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes. *Kidney International*. 71: 290-297.

Daniele C, Mazzanti G, Pittler MH, Ernst E. 2006. Adverse-event profile of *Crataegus spp.*: a systematic review. *Drug Safety*. 29(6): 523-35.

Davis AL, Cai Y, Davies AP, Lewis JR. 1996. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 34: 887-890.

Degenring FH, Suter A, Weber M, Saller R. 2003. A randomized double blind placebo controlled clinical trial of a standardised extract of fresh *Crataegus* berries (Crataegisan®) in the treatment of patients with congestive heart failure NYHA II. *Phytomedicine* 10: 363–369.

Dood KO, Frey AD, Geisbuhler TP. 2013. The effect of hawthorn extract on coronary flow. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 18(4):257-264.

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

Eggleston WW. 1909. The *Crataegi* of Mexico and Central America. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 36: 501-514.

El-Azime AS, Ossman NN. 2013. Protective effect of hawthorn (*Crataegus Linn*) against radiation-induced damage in rats. *Arab Journal of Nuclear Science and Applications*. 46(1): 304-312.

Gehrke CW, Wixom, RL, Bayer E. 2001. Chromatography: a century of discovery 1900-2000. *Journal of Chromatography*. 64: 705 pp.

Hernández-Pérez A. 2014. Actividad vasorrelajante en aorta aislada de rata y constituyentes triterpénicos de extractos de *Crataegus gracilior* Phipps (Rosaceae). Tesis de maestría. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. 1-76.

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

Holubarsch CJF, Colucci WS, Meinertz T, Gaus W, Tendera M. 2008. The efficacy and safety of *Crataegus* extract WS1442 in patients with heart failure: The SPICE trial. *European Journal of Heart Failure*. 10: 1255–1263

Huang SS; Lin Y; Diao YP. 2009. Effects of charred fructus *Crataegi* alcohol extract on contractility of isolated rat gastric and intestine muscle strips. *Progress in Modern Biomedicine*. 9: 612–614.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2014. Estadísticas a propósito del día de muertos. Consultado en: [www.inegi.org.mx](http://www.inegi.org.mx) [02 de noviembre de 2014].

Kim SH, Kang KW, Kim KW, Kim ND. 2000. Procyanidins in *Crataegus* extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sciences*. 67:121-131.

Koch E, Malek, FA. 2011. Standardized extracts from hawthorn leaves and flowers in the treatment of cardiovascular disorders—preclinical and clinical studies. *Planta Medica*. 77: 1123–1128.

Kojima H, Sato N, Hatano A, Ogura H. 1990. Sterol glycosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*. 29: 2351-2355.

Krishnan P, Kruger NJ, Ratcliffe RG. 2005. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *Journal of Experimental Botany, Making Sense of the Metabolome Special Issue*. 56 (410): 255–265.

Lo YYE, Stefanović S, Dickinson TA. 2009. Population genetic structure of diploid sexual and polyploid apomictic hawthorns (*Crataegus*; Rosaceae) in the Pacific Northwest. *Molecular Ecology*. 18: 1145–1160.

Long SR, Carey RA, Crofoot KM, Proteau PJ, Filtz TM. 2006. Effect of hawthorn (*Crataegus oxycantha*) crude extract and chromatographic fractions on multiple activities in a cultured cardiomyocyte assay. *Phytomedicine*. 13: 643–650

López-Corona MGB. 2013. Identificación y cuantificación del ácido clorogénico y de flavonoides presentes en hojas y frutos de *Crataegus gracilior* Phipps. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. 1-57.

Madhu C, Manish K, Upendra S, Neeraj K, Bikram S, Satwinderjeet K. 2016. Isolation and characterization of flavanols from *Anthocephalus cadamba* and evaluation of their antioxidant, antigenotoxic, cytotoxic and COX-2 inhibitory activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* (en prensa).

Marston A, Hostettmann K. 2009. Natural Product Analysis over the Last Decades. *Planta Medica*. 75(7): 672-682.

Núñez-Colín CA, Valadez-Moctezuma E, Barrientos-Priego AF, González-Andrés F, Nieto-Ángel R. 2011. Variación de la región ribosómica nuclear en *Crataegus* L. del centro y sur de México. *Agronomía mesoamericana*. 22(1):01-10.

Núñez-Colín CA, Nieto-Ángel R, Barrientos-Priego AF, Sahagún-Castellanos J, Segura S, González-Andrés F. 2008a. Variability of three regional sources of germplasm of Tejocote (*Crataegus* spp.) from central and southern Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 55: 1159-1165.

Núñez-Colín CA, Nieto-Ángel R, Barrientos-Priego AF, Segura S, Sahagún-Castellanos J, González-Andrés F. 2008b. Distribución y caracterización eco-climática del género *Crataegus* L. (Rosaceae, subfam. Maloideae) en México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 14(2): 177-184.

OMS (Organización Mundial de la Salud). 2014. Enfermedades cardiovasculares. Consultado en: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/es/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/) [02 de noviembre de 2014].

Phipps JB, O'Kennon RJ, Lance RW. 2003. Hawthorns and medlars. Timber Press, Portland USA. 139 p.

Ratcliffe RG, Roscher A, Shachar-Hill Y. 2001. Plant NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 39: 267–300.

Ratcliffe RG, Shachar-Hill Y. 2001. Probing plant metabolism with NMR. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52, 499–526.

RAE (Real Academia Española). 2001. Diccionario de la lengua española (22<sup>a</sup> edición). Consultado en: <http://www.rae.es/> [26 de septiembre de 2014].

Rzedowski J, Calderón-de-Rzedowski G. 2005. Flora del Bajío y de regiones adyacentes, Rosaceae. Pátzcuaro, Michoacán, México. INECOL Instituto de Ecología A.C. Fascículo 135:48-54.

Sarker SD, Latif Z, Gray AI. 2006. Natural Products Isolation. Humana Press Inc, New Jersey USA. 515p.

Schwinger RH, Pietsch M, Frank K, Brixius K. 2000. *Crataegus* special extract WS 1442 increases force of contraction in human myocardium cAMP-independently. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 35:700–7.

Shahat AA, Ismail S, Hammouda FM, Azzam SA, Lerner G, De-Bruyne T, De-Swaef S, Pieters L, Vlietinck A. 1998. Anti-HIV activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Phytomedicine*. 5(2):133-136.

Steinmann D, Ganzera M. 2011. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 55: 744–757.

Talent N, Dickinson TA. 2005. Polyploidy in *Crataegus* and *Mespilus* (Rosaceae, Maloideae): evolutionary inferences from flow cytometry of nuclear DNA amounts. *Canadian Journal of Botany*. 83: 1268–1304.

Tauchert M. 2001. Efficacy and safety of *Crataegus* extract WS 1442 in comparison with placebo in patients with chronic stable New York Heart Association class-III heart failure. *American Heart Journal*. 143(5): 910-915.

University of British Columbia Botanical Garden and Centre for Plant Research. 2009. Botany Photo of the Day. Consultado en: <http://www.botanicalgarden.ubc.ca> [23 de octubre de 2014].

USDA. United States Department of Agriculture. 2006. Agricultural Research Service: Dr. Duke's phytochemical and ethnomedicinal database. Consultado en: <http://www.ars-grin.gov/duke/> [23 de octubre de 2014].

Veit M, Wittig J. 2005. Qualitätskontrolle von *Crataegus* Extrakten und Zubereitungen. *Pharmazie in unserer Zeit*. 1: 34-41.

Verma SK, Jain V, Verma D, Khamesra R. 2007. *Crataegus oxyacantha* - a cardioprotective herb. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*. 1(1): 65-71.

Wang B, Qiu WW, Yu YY, Yang F, Tang J. 2009. Progress of study on maslinic acid. *Chinese Bulletin of Life Sciences*. 21: 264–269.

Weigl A, Assmus KD, Neukum-Schmidt A, Schmitz J, Zapfe G, Noh HS, Siegrist J. 1996. *Crataegus* special extract WS 1442: Assessment of objective effectiveness in patients with heart failure. *Fortschritte der Medizin*. 114(24): 291-96.

Wu J, Peng W, Qin R, Zhou H. 2014. *Crataegus pinnatifida*: Chemical constituents, pharmacology and potential applications. *Molecules*. 19: 1685-1712.

Yang SX, Wang XC, Wang ZX, Han J, Liu DL, Zhang Y. 2010. Discussion of Hawthorn foods in the reduction of azithromycin's side-effect. *China Medical Herald*. 7: 175–176.

## 11. ANEXO

Espectros de Resonancia Magnética nuclear selectos de los compuestos **1**, **2** y **3**  
(500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, TMS y C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)

### CONTENIDO

Figura		Página
A1	Espectro de RMN <sup>1</sup> H completo del compuesto <b>1</b> (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N como referencia interna)	61
A2	Ampliación de campo bajo del espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto <b>1</b>	61
A3	RMN <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY del compuesto <b>1</b> . a) Completo b) Ampliación de la zona de campo alto	62
A4	Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto <b>1</b>	63
A5	APT completo del compuesto <b>1</b>	63
A6	HSQC del compuesto <b>1</b>	64
A7	HMBC del compuesto <b>1</b>	64
A8	Espectro de RMN <sup>1</sup> H completo del compuesto <b>2</b>	65
A9	Espectro de RMN <sup>13</sup> C completo del compuesto <b>2</b>	65
A10	<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY del compuesto <b>2</b> . a) Completo b) Ampliación de la zona de campo alto	66
A11	APT completo del compuesto <b>2</b>	67
A12	HSQC-APT del compuesto <b>2</b>	67

A13	HMBC del compuesto <b>2</b>	68
A14	Espectro de RMN $^1\text{H}$ completo del compuesto <b>3</b>	68
A15	Ampliación de la zona de los metinos de la glucosa ( <b>3</b> )	69
A16	Ampliación de la zona de los metilos del compuesto <b>3</b>	69
A17	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY del compuesto <b>3</b>	70
A18	RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>3</b>	70
A19	APT del compuesto <b>3</b>	71
A20	HSQC del compuesto <b>3</b> . Ampliación de una zona	71
A21	HSQC del compuesto <b>3</b> . Ampliación de una zona	72
A22	HSQC del compuesto <b>3</b> . Ampliación de la zona de los metilos	72
A23	HMBC del compuesto <b>3</b>	73
A24	HMBC del compuesto <b>3</b> . Ampliación de una región del espectro	73
A25	HMBC del compuesto <b>3</b> (otra ampliación)	74
A26	HMBC del compuesto <b>3</b> . Región de todos los metinos oxigenados	74

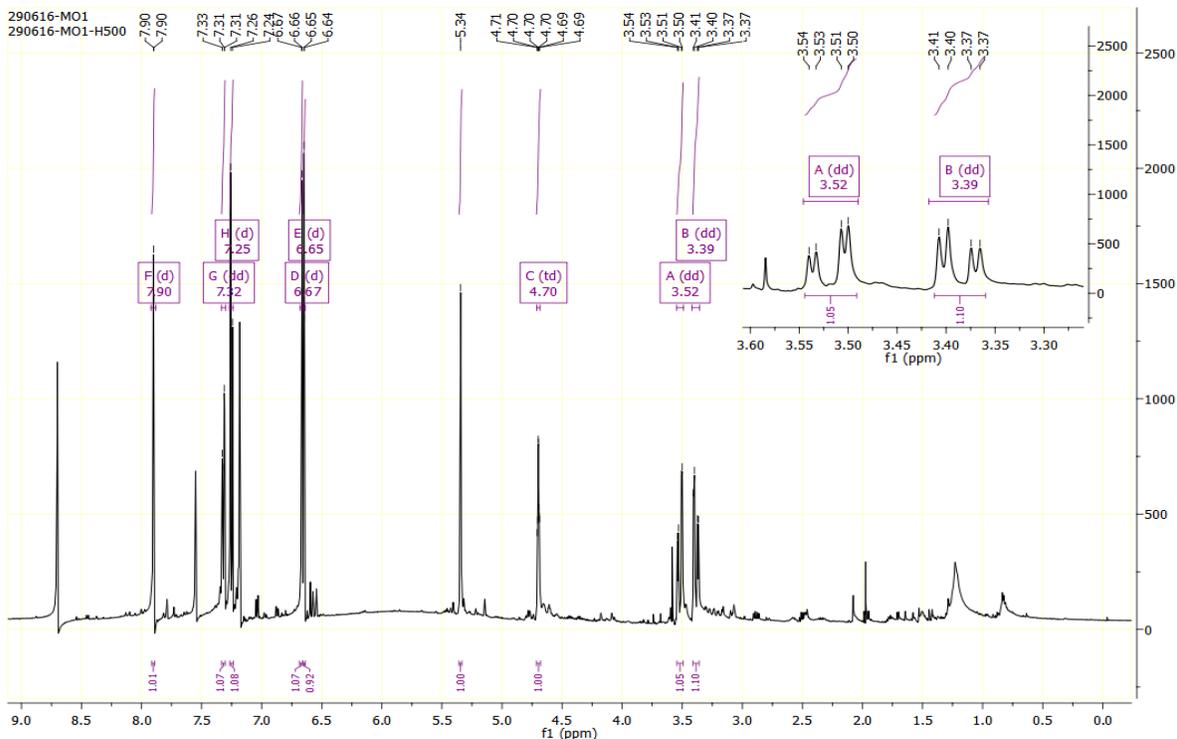


Figura A1. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  completo del compuesto **1** ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  como referencia interna).

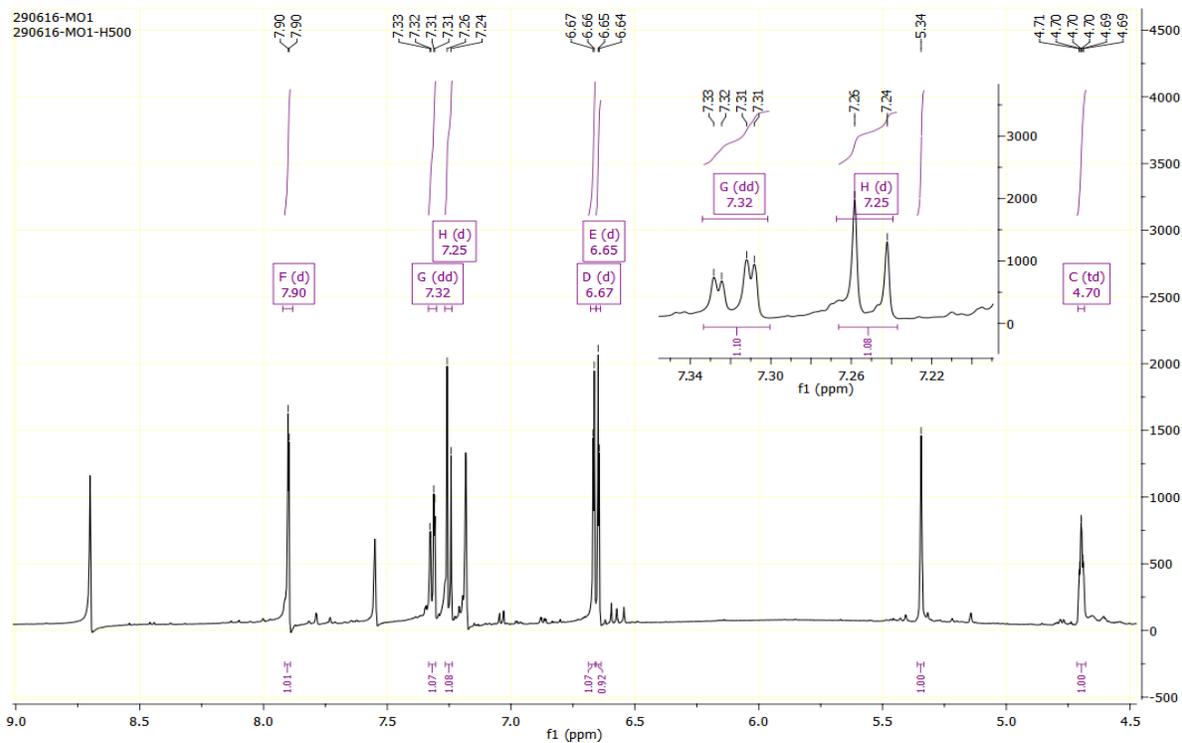


Figura A2. Ampliación de campo bajo del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **1**.

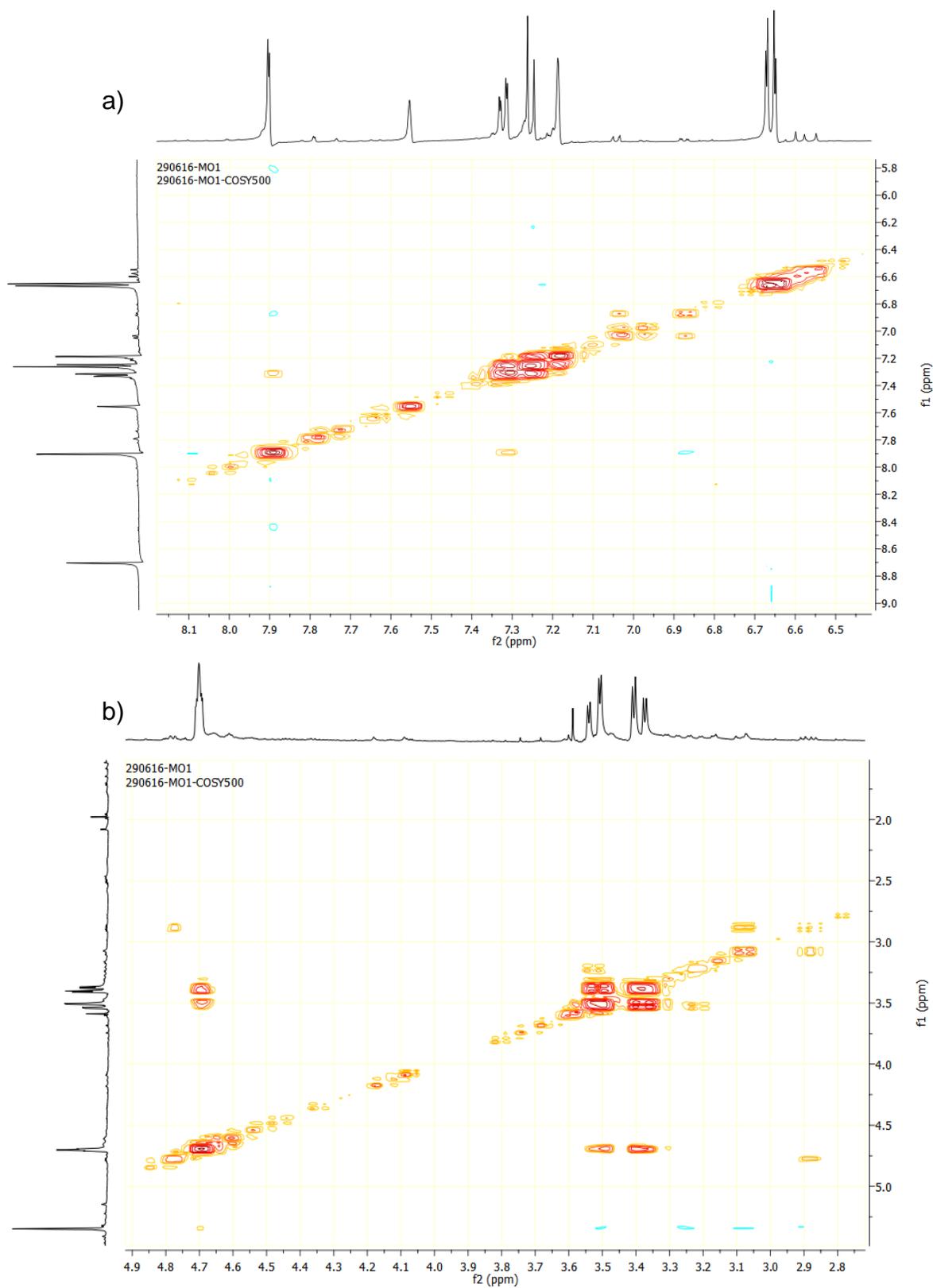


Figura A3. RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY del compuesto **1**. a) Completo, b) Ampliación de la zona de campo alto.

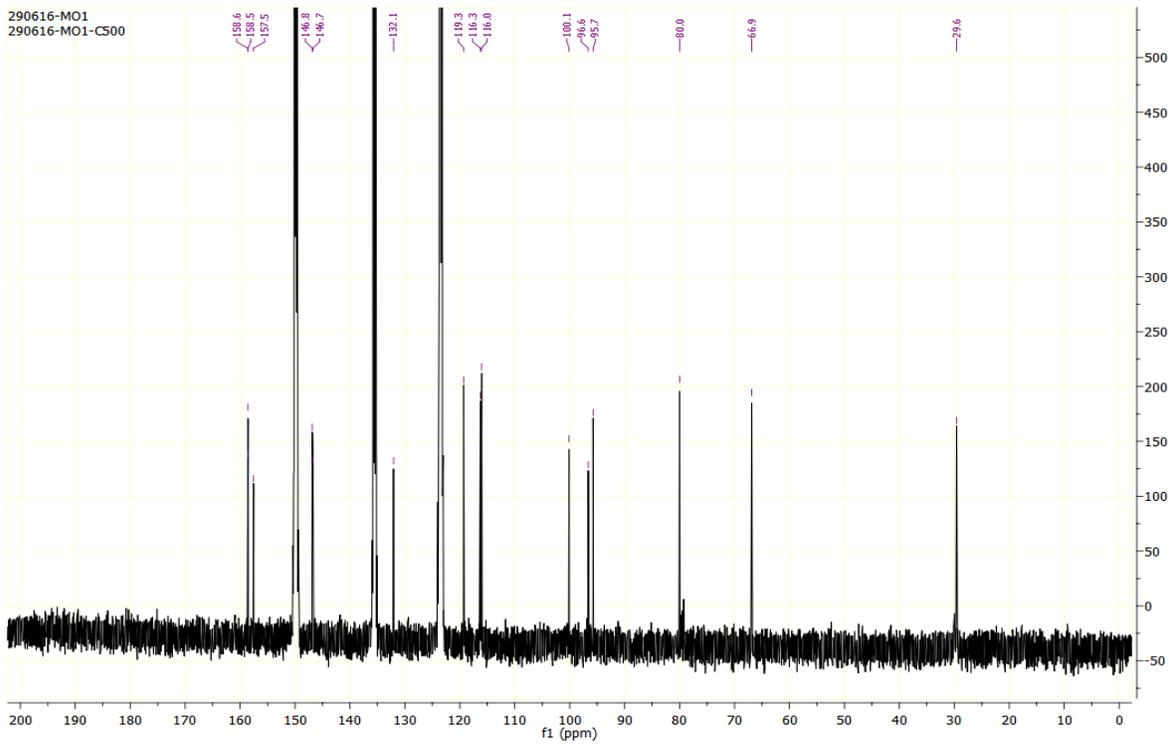


Figura A4. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 1.

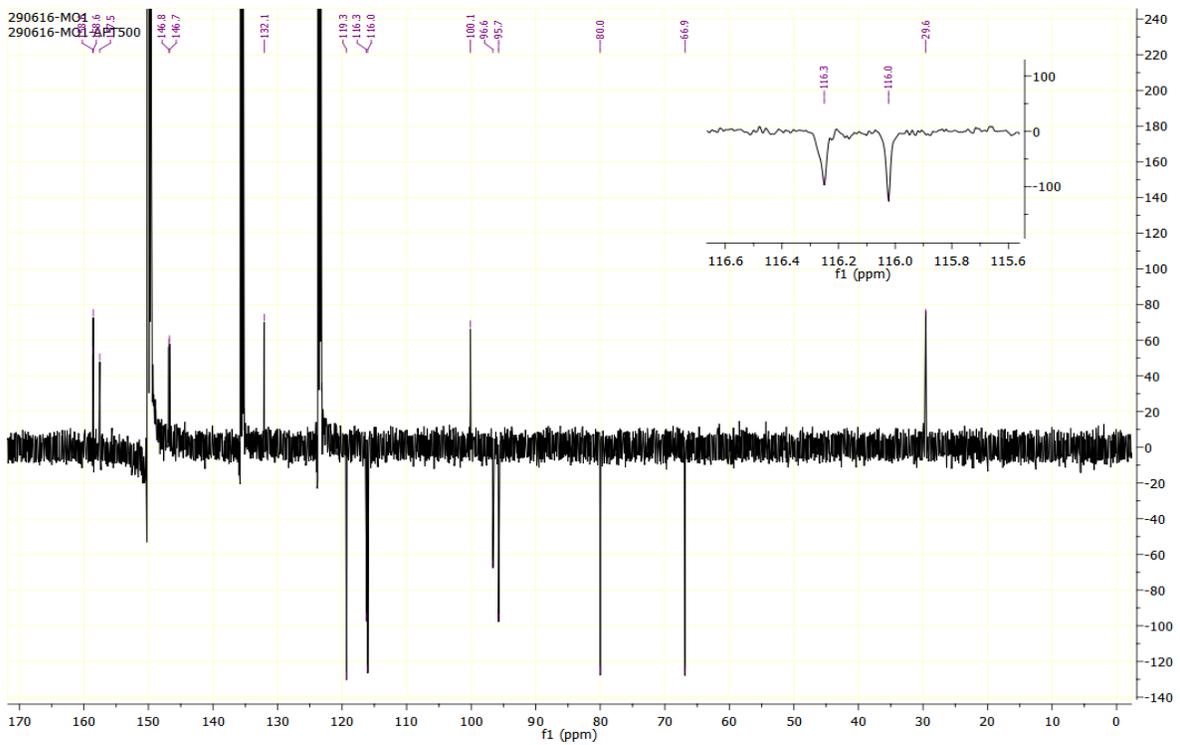


Figura A5. APT completo del compuesto 1.

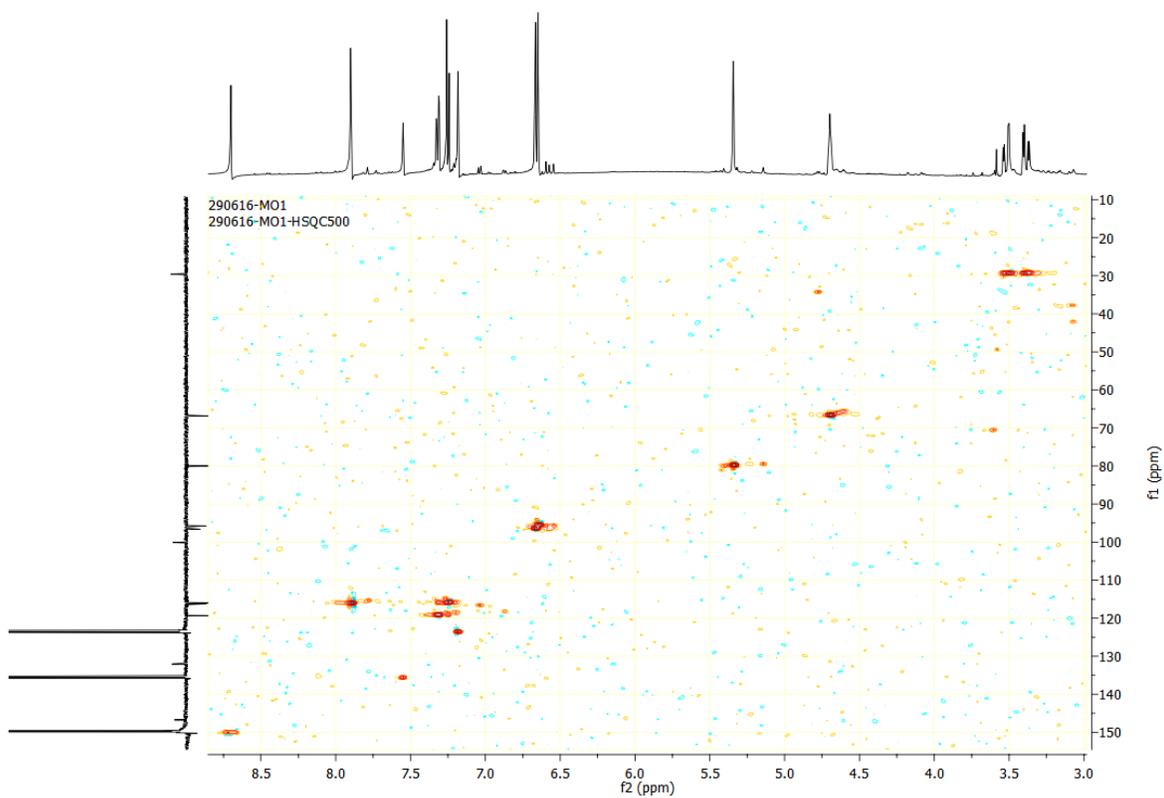


Figura A6. HSQC del compuesto 1.

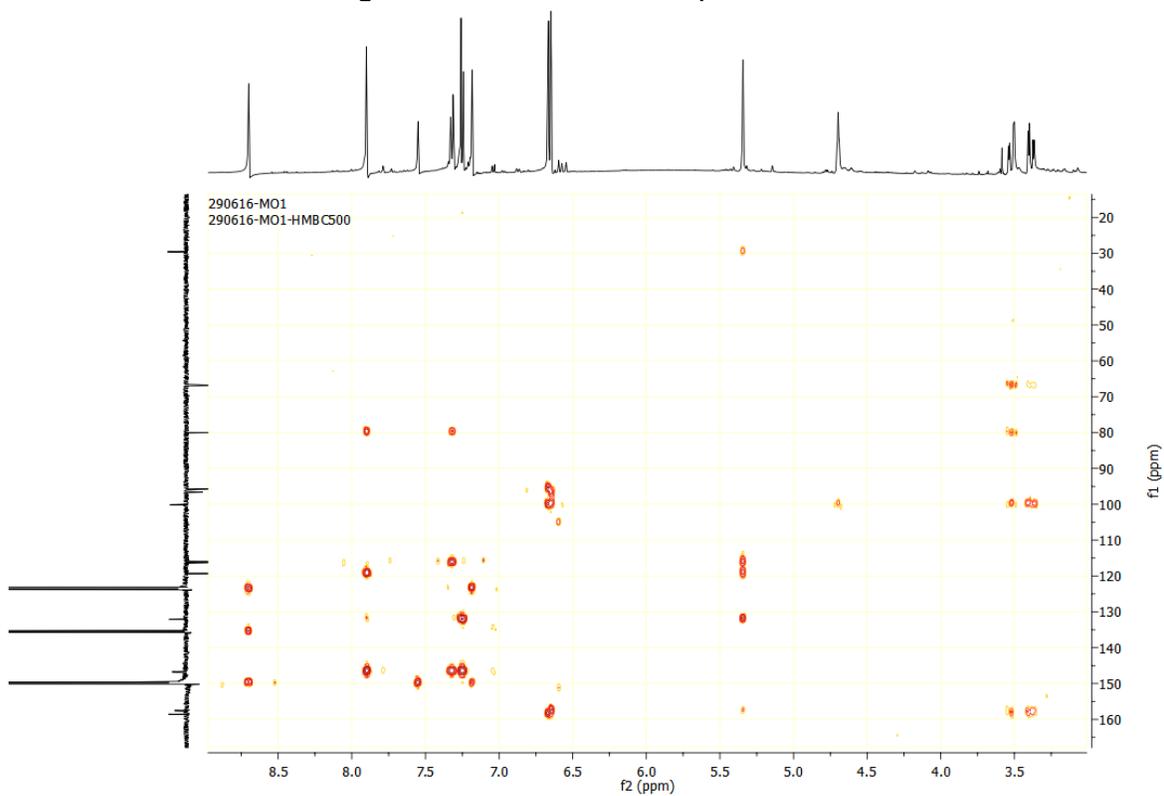


Figura A7. HMBC del compuesto 1.

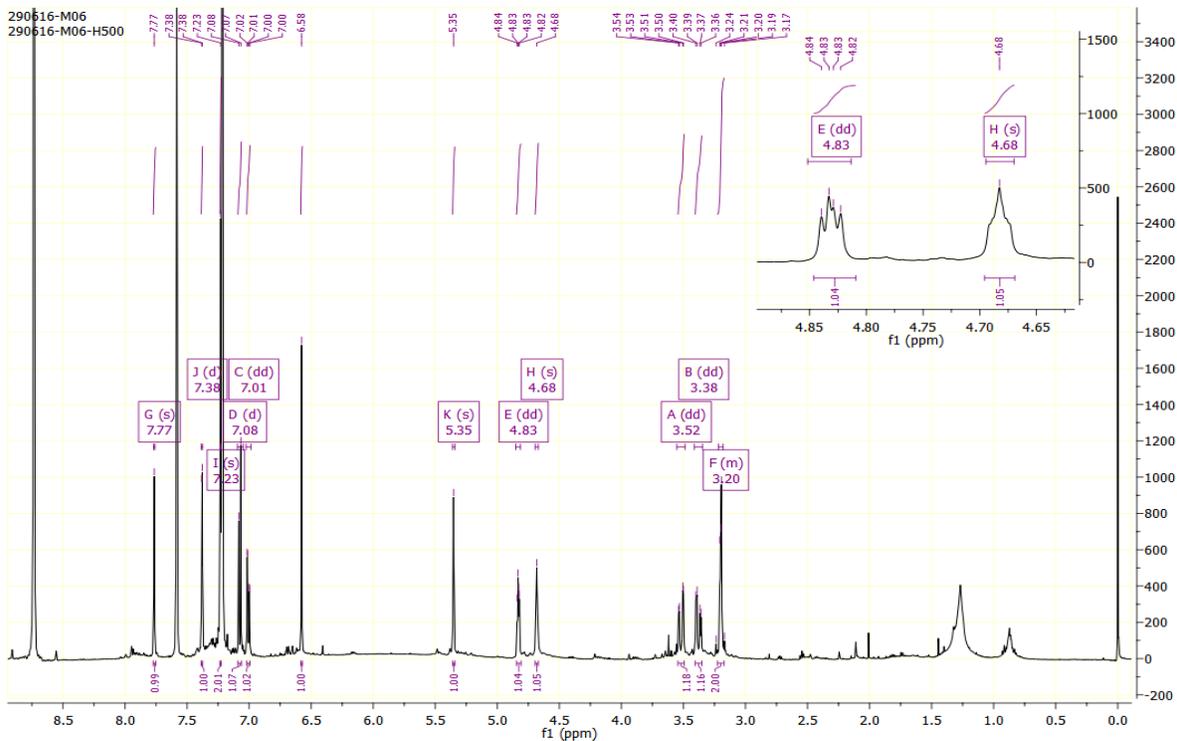


Figura A8. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  completo del compuesto **2** (TMS como referencia interna).

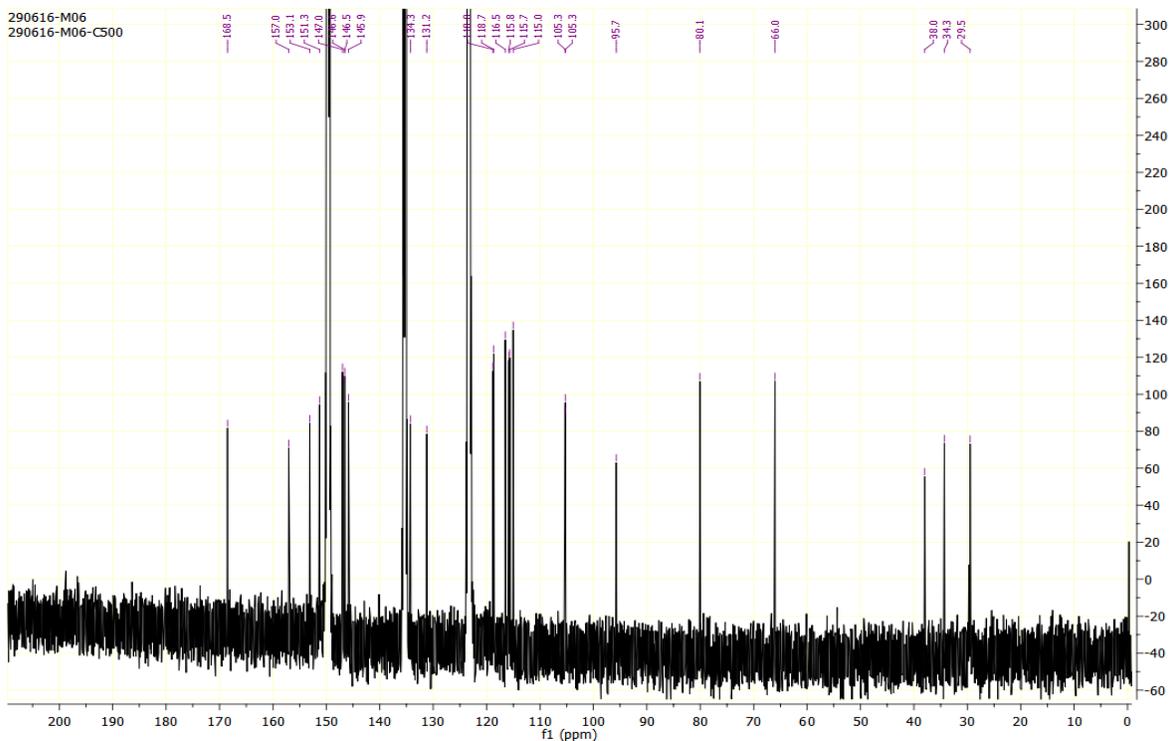


Figura A9. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  completo del compuesto **2**.

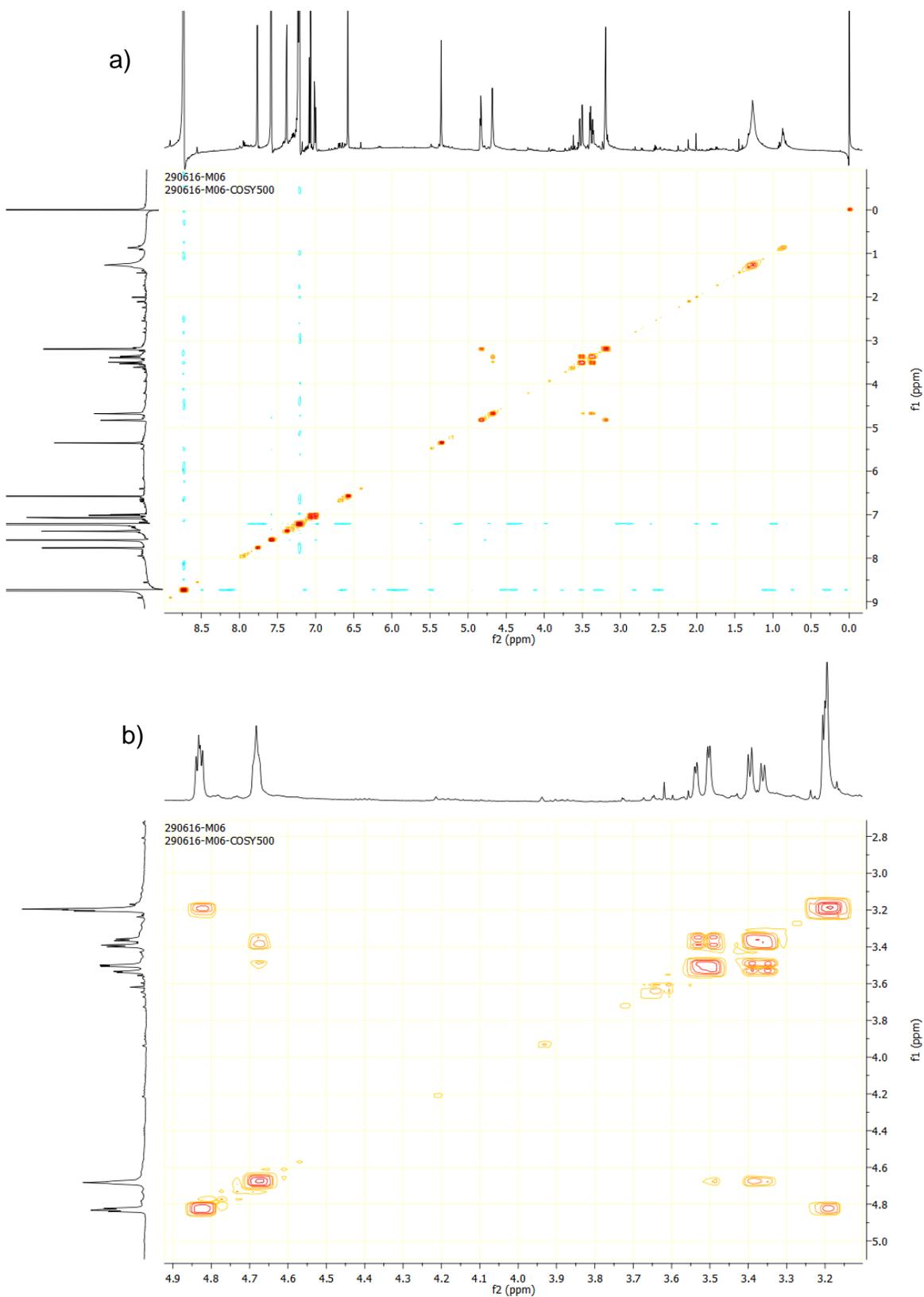


Figura 10.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY del compuesto **2**. a) Completo, b) Ampliación de la zona de campo alto.

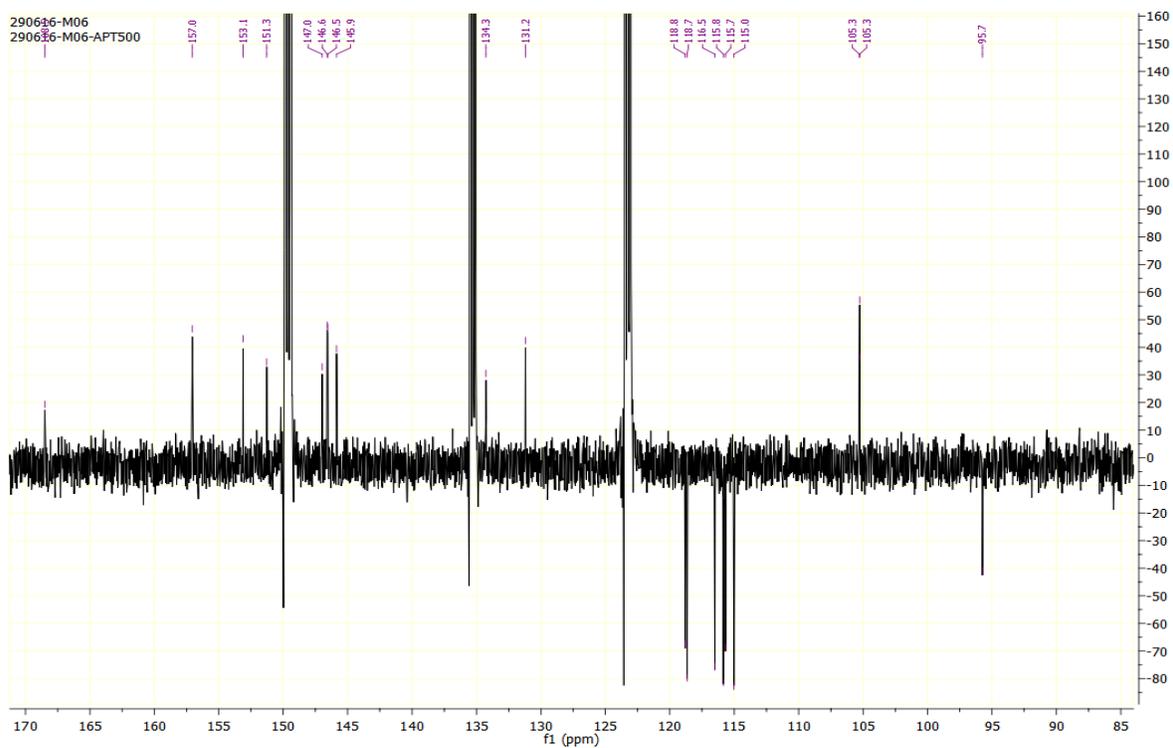


Figura A11. APT completo del compuesto 2.

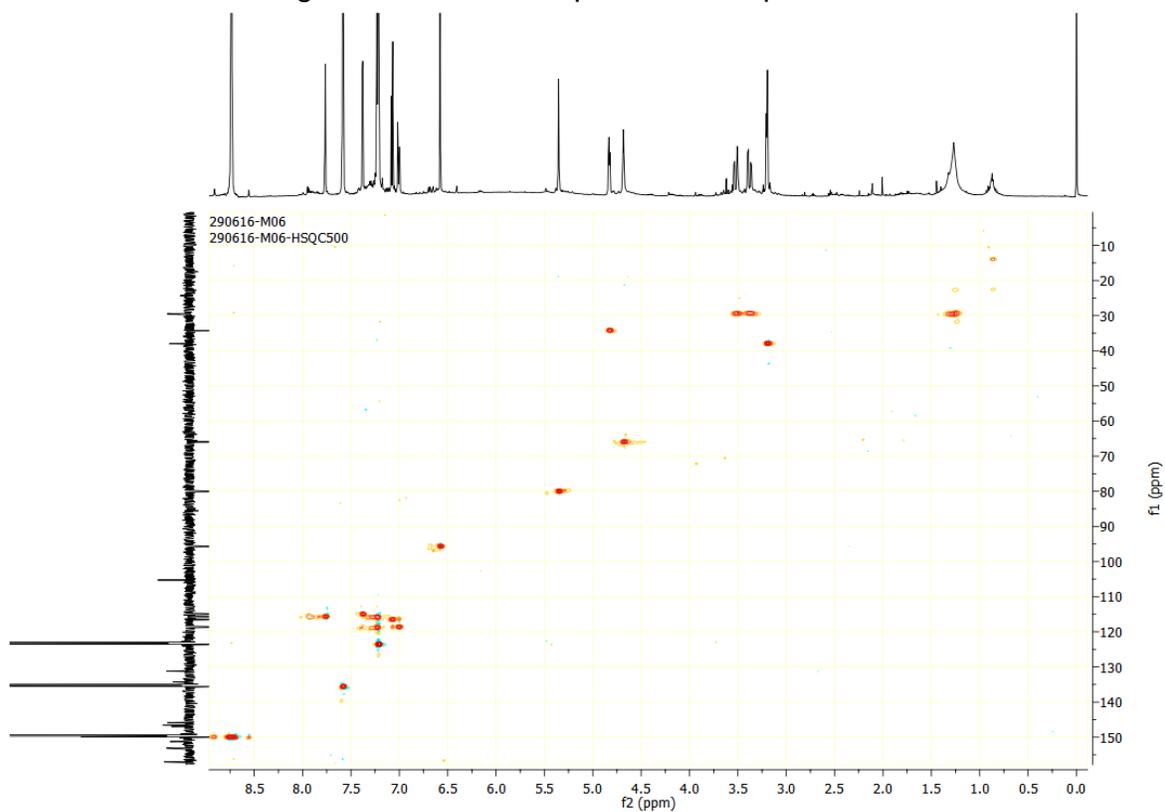


Figura A12. HSQC-APT del compuesto 2.

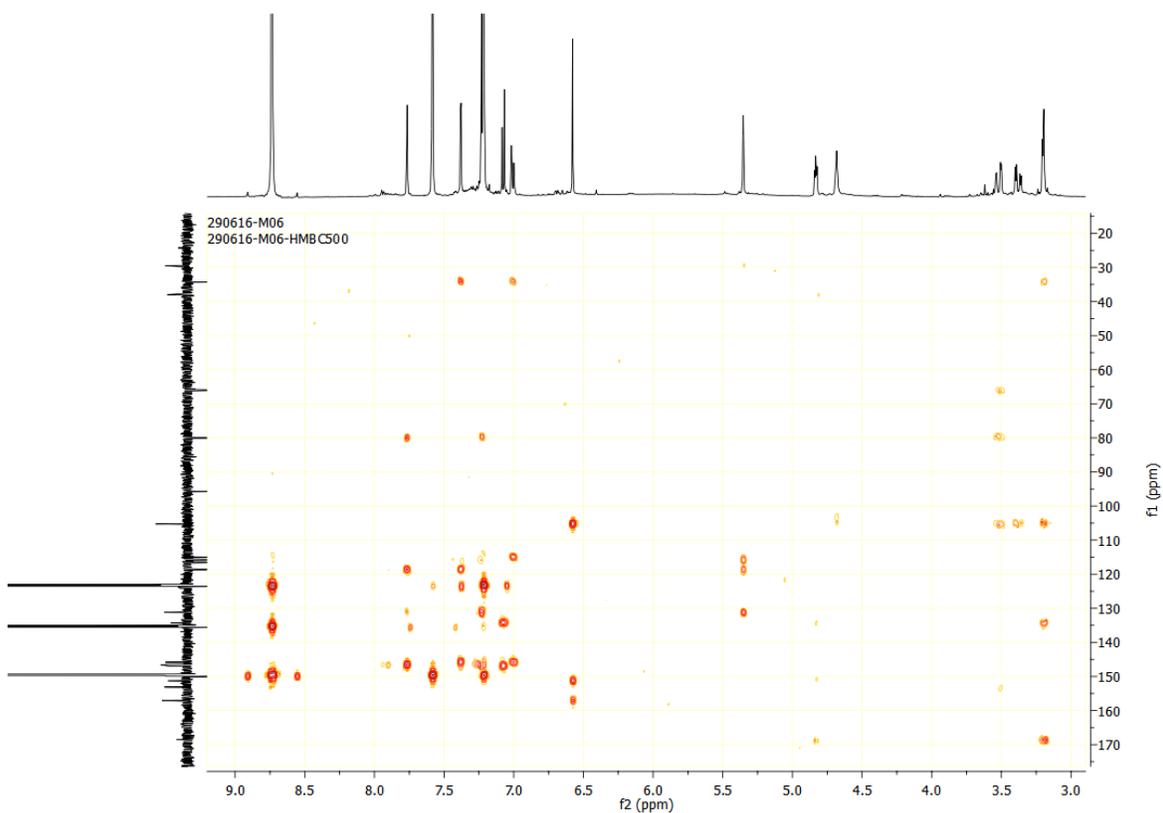


Figura A13. HMBC del compuesto 2.

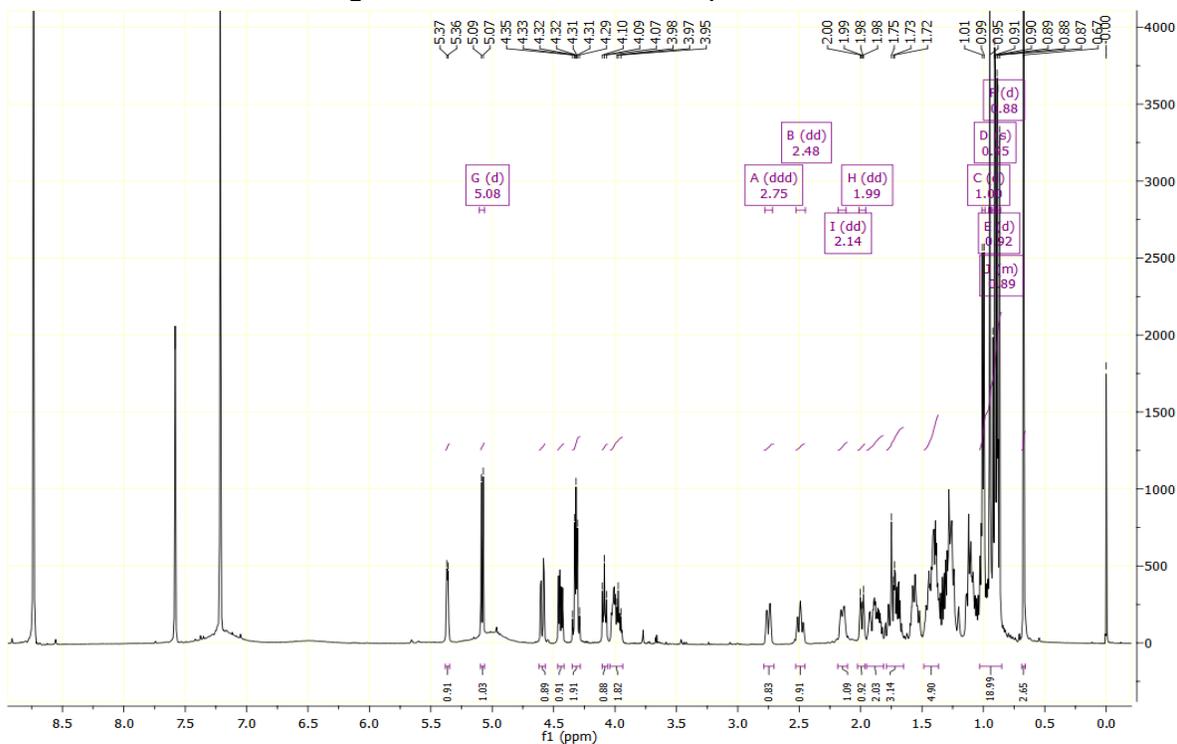


Figura A14. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  completo del compuesto 3 (TMS como referencia interna).

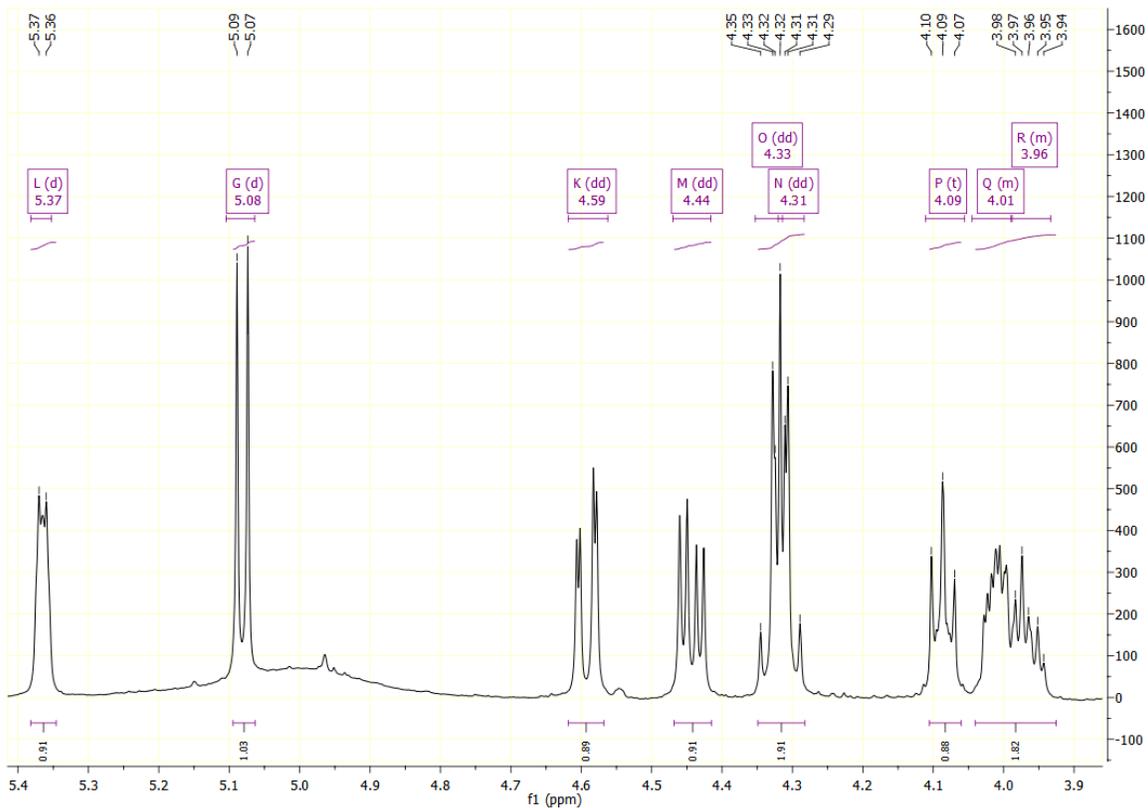


Figura A15. Ampliación de la zona de los metinos de la glucosa (3).

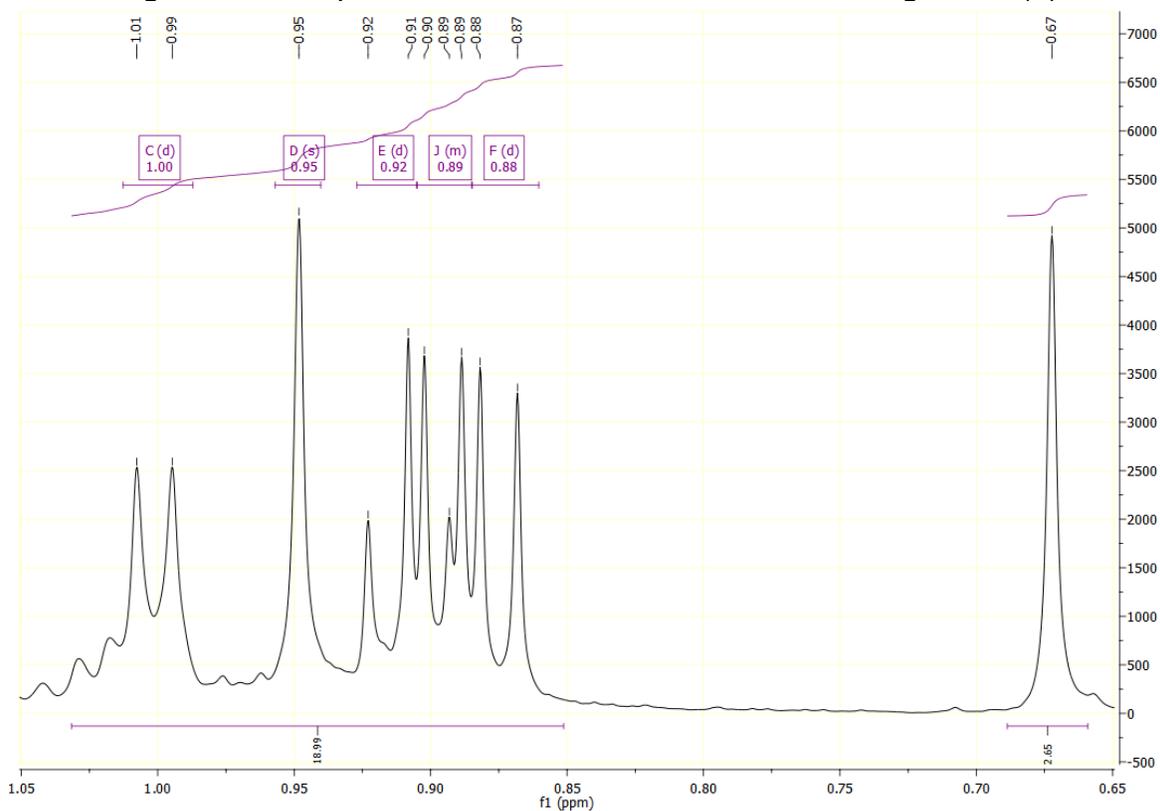


Figura A16. Ampliación de la zona de los metilos del compuesto 3.

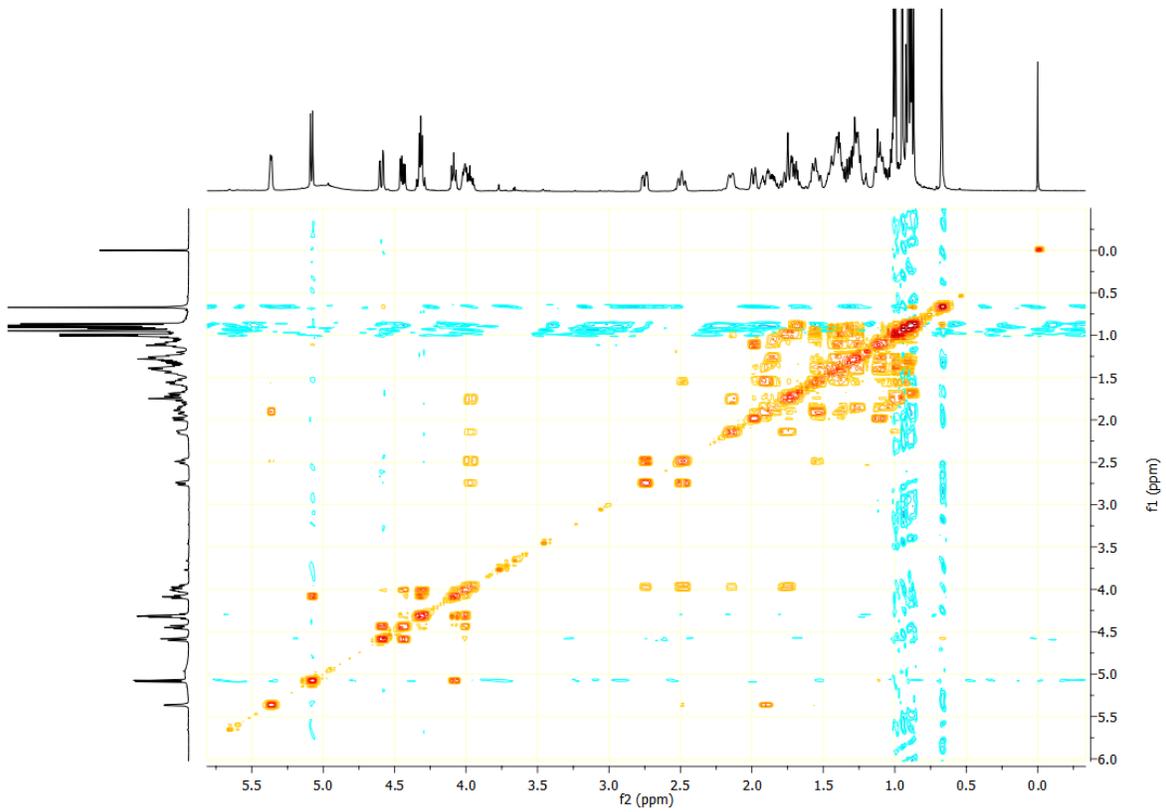


Figura A17.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY del compuesto 3.

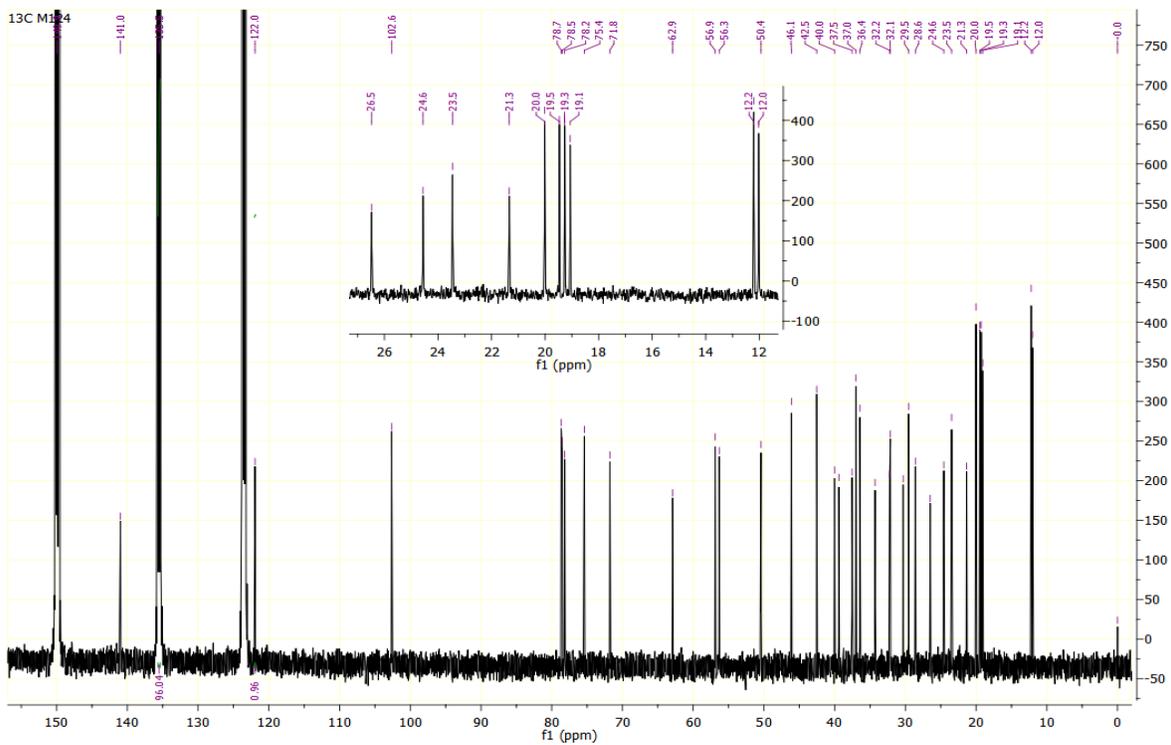


Figura A18. RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 3.

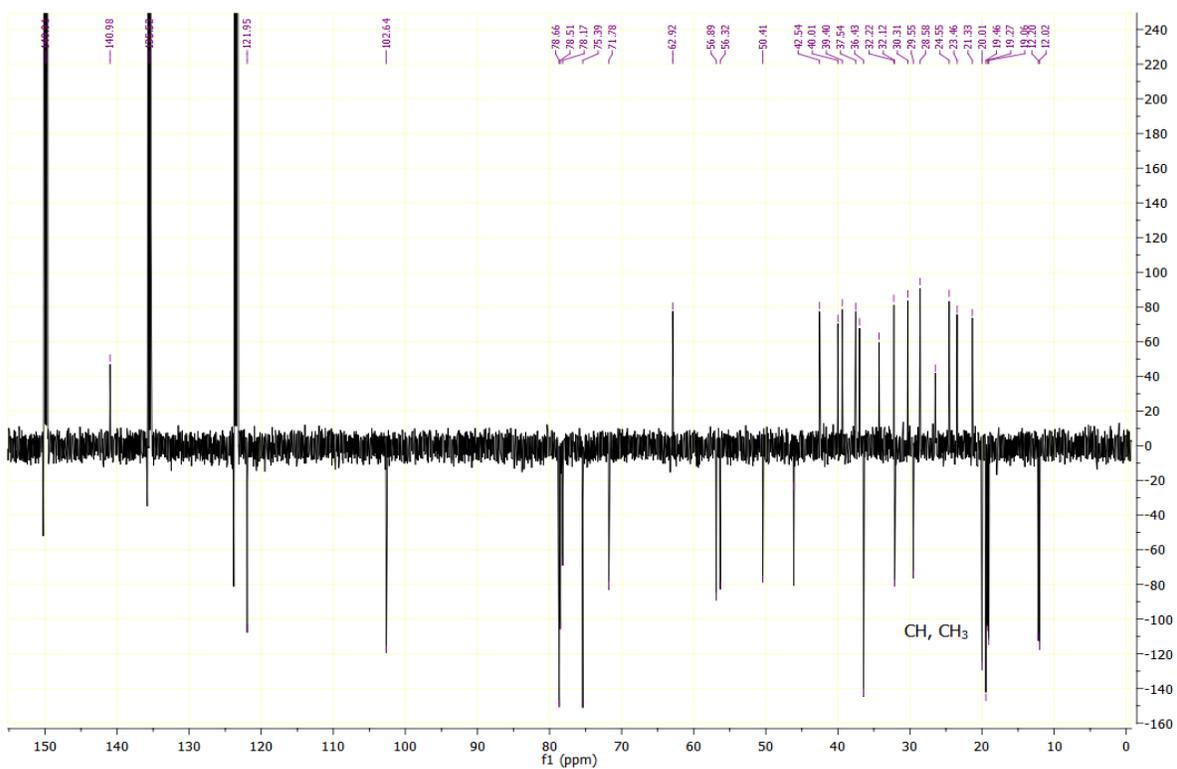


Figura A19. APT del compuesto 3.

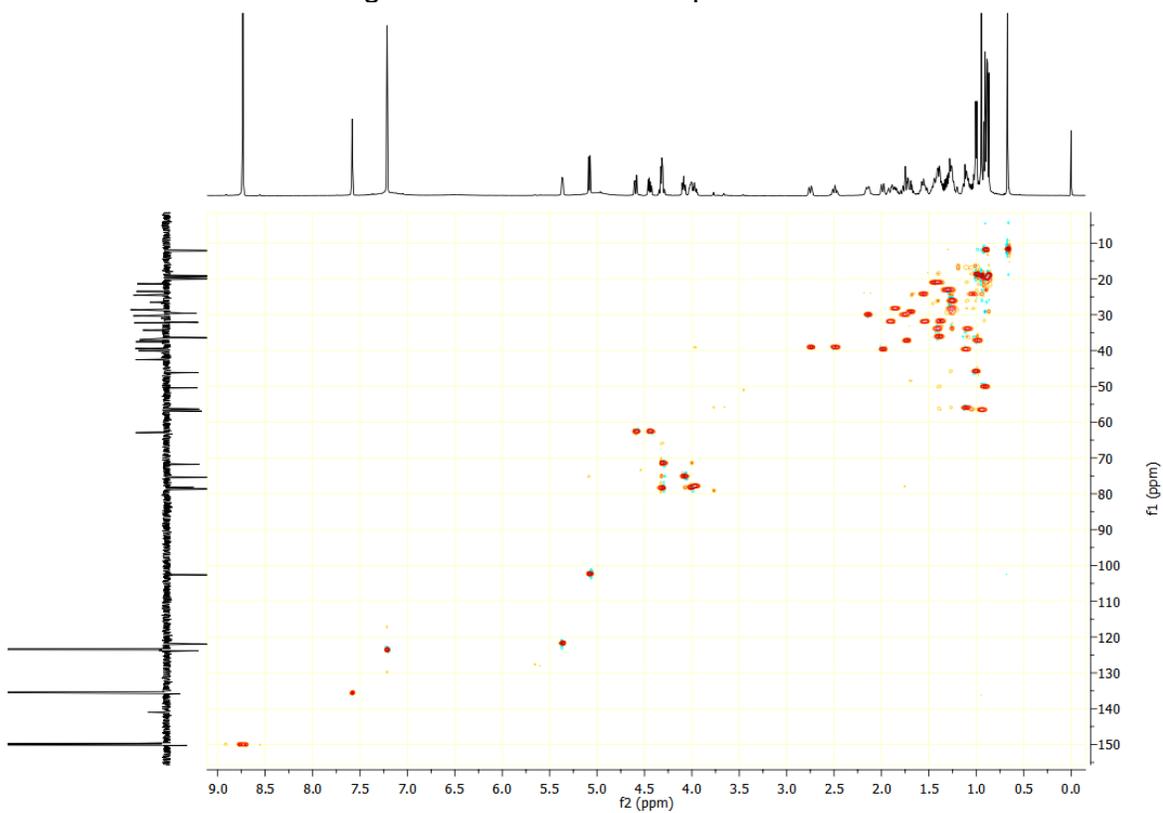


Figura A20. HSQC del compuesto 3.

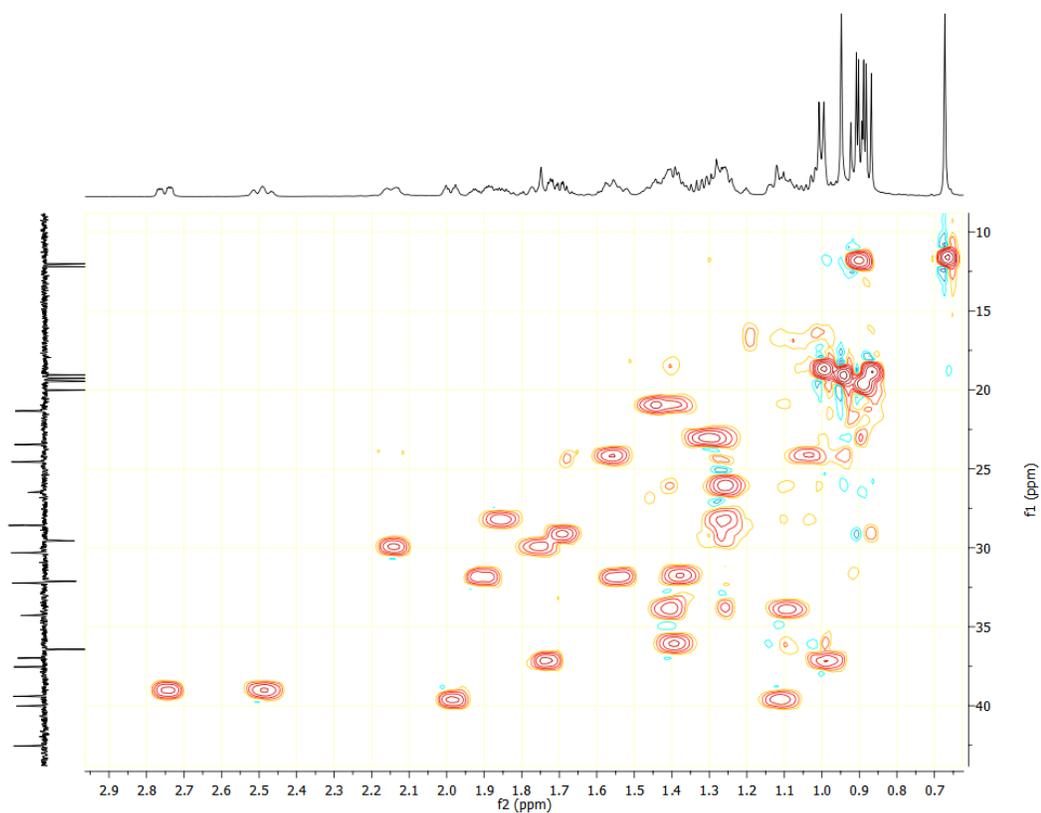


Figura A21. HSQC del compuesto **3**. Ampliación de una zona.

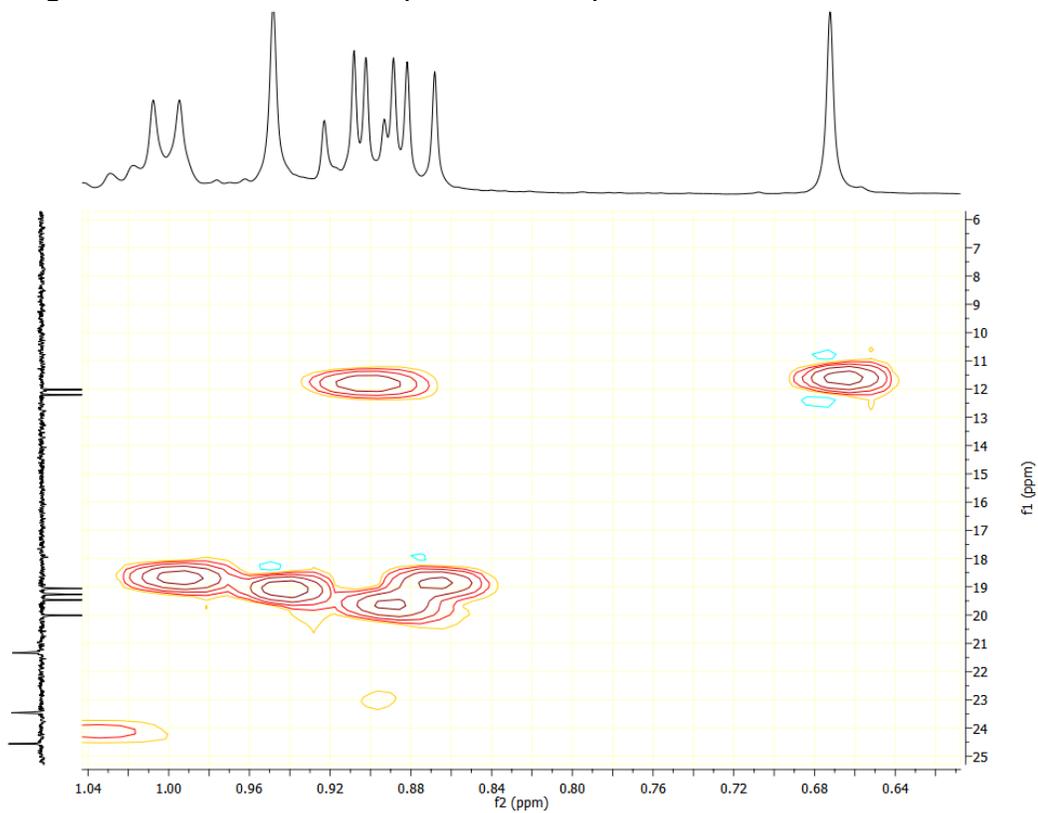


Figura A22. HSQC del compuesto **3**. Ampliación de la zona de los metilos.

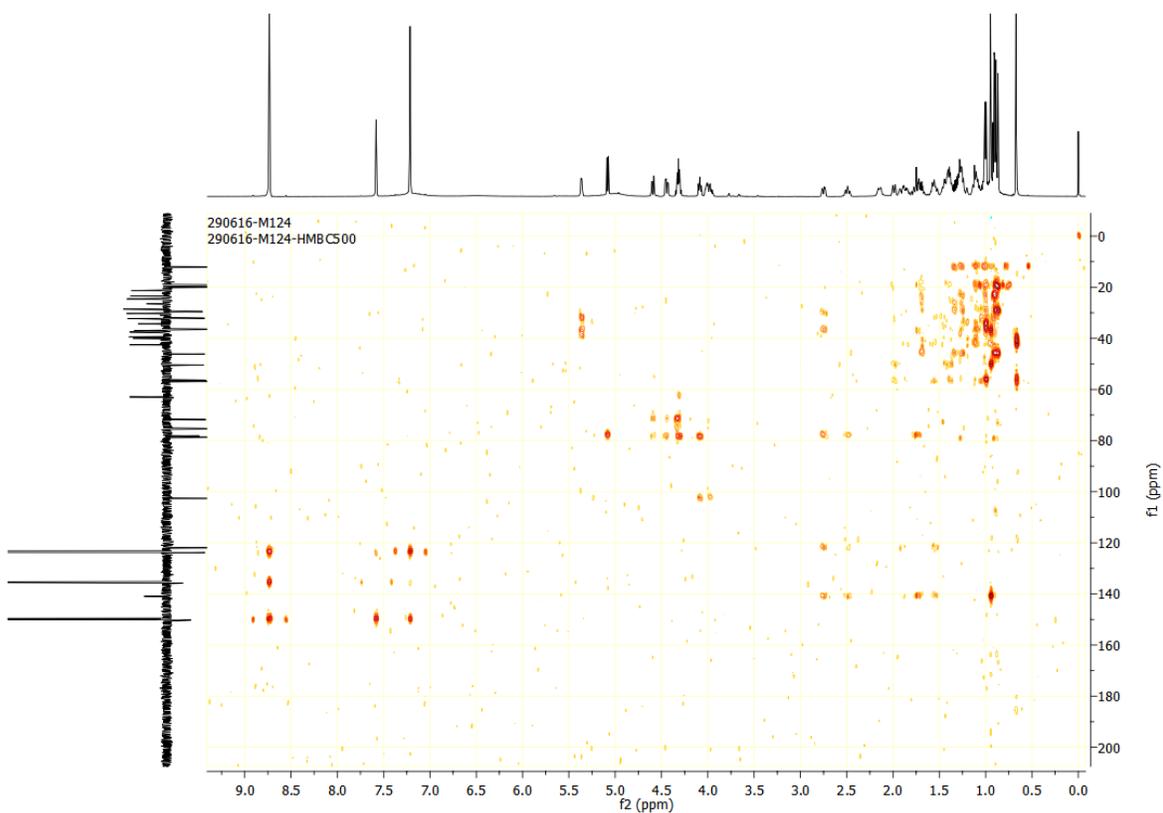


Figura A23. HMBC del compuesto **3**

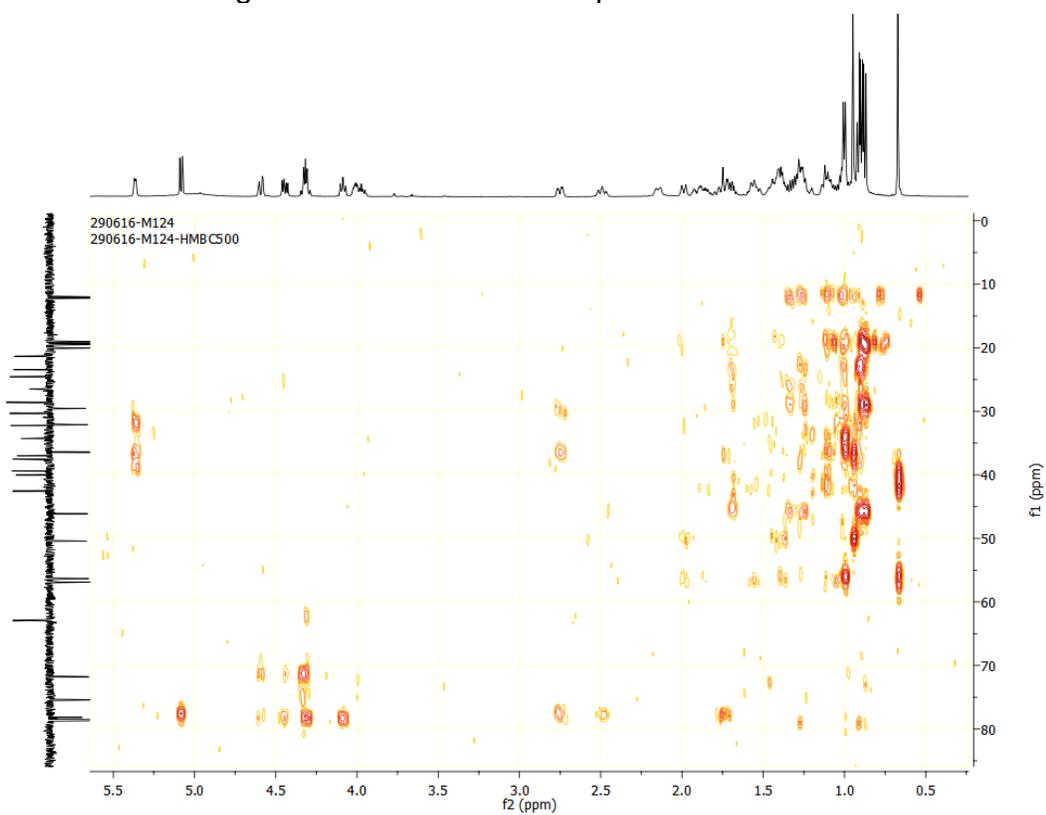


Figura A24. HMBC del compuesto **3**. Ampliación de una región del espectro.

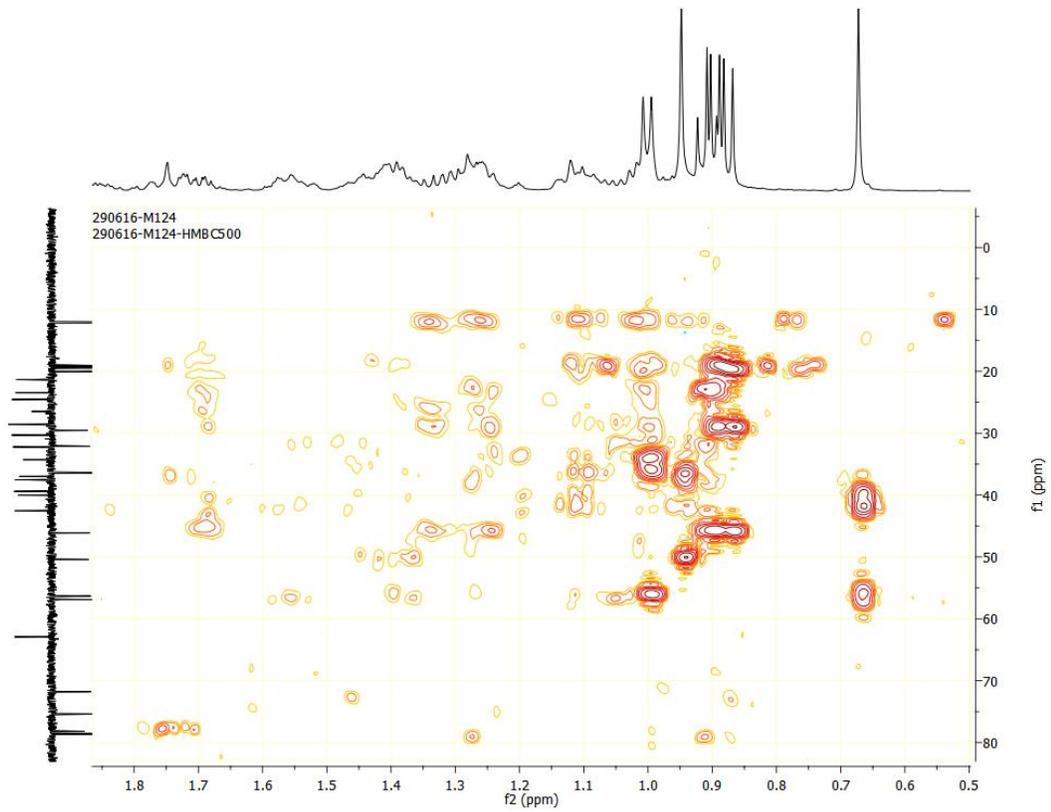


Figura A25. HMBC del compuesto 3 (otra ampliación).

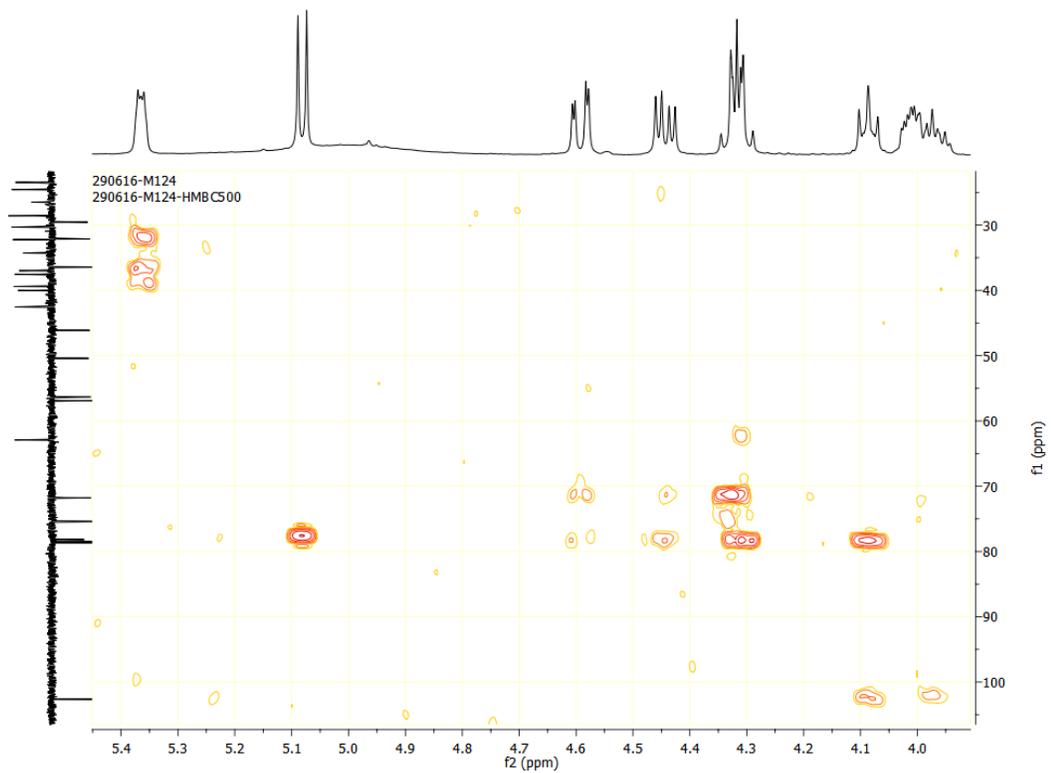


Figura A26. HMBC del compuesto 3. Región de todos los metinos oxigenados.