



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

**ESTUDIO QUÍMICO PRELIMINAR DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS Y
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FLOR DE *Crataegus*
gracilior PHIPPS**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

DANIELA ALEJANDRA TORRES ORTIZ

DIRIGIDA POR

DR. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2017



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

**Estudio químico preliminar de los metabolitos secundarios y
evaluación de la capacidad antioxidante de la flor de *Crataegus
gracilior* PHIPPS**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA
QFBT. DANIELA ALEJANDRA TORRES ORTIZ
DIRIGIDO POR:
DR. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SINODALES


Dr. Mamadou Moustapha Bah
Presidente

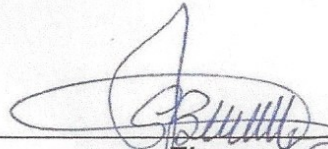
Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas
Secretario

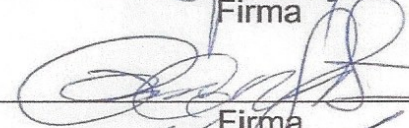
Dra. María Guadalupe García Alcocer
Vocal

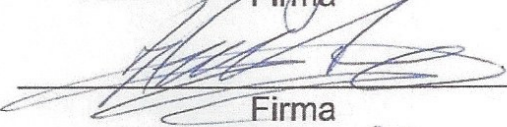
Dra. Miriam Rocío Estévez González
Sinodal

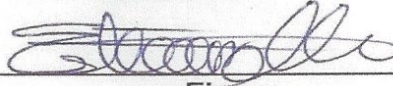
Dr. José Alejandro García Arredondo
Sinodal



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

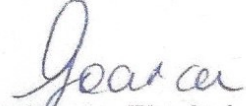

Firma


Firma


Firma


Firma


Firma


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

RESUMEN

El género *Crataegus* tiene aproximadamente 280 especies a nivel mundial. En México, se han identificado alrededor de 15 especies, todas conocidas como tejocote, 9 de ellas endémicas. Uno de los usos medicinales más reconocidos de esas especies vegetales es en las enfermedades cardiovasculares. La composición química de algunos miembros del género ha sido ampliamente estudiada en otros países con el fin de desarrollar extractos estandarizados. Los compuestos caracterizados han consistido más frecuentemente en fenólicos y terpenos, principalmente triterpenos. En la actualidad, existen diversos extractos estandarizados en venta para el público, como el WS[®] 1442 y el M1330, que permiten la regulación de la presión arterial y del infarto cardiaco, dos de los padecimientos más crecientes en el mundo. En el presente proyecto, se obtuvo el extracto metanólico de las flores secas de *C. gracilior*, muestra recolectada en Pinal de Amoles, Querétaro, México. Debido a que la actividad farmacológica de algunos de los metabolitos secundarios presentes en las especies de *Crataegus* se ejerce en parte a través de su capacidad antioxidante, se determinó dicha capacidad, utilizando métodos electroquímicos (voltametría cíclica) y colorimétricos (DPPH). Mediante el pimer método, se encontró que el extracto tiene la misma capacidad antioxidante que el Trolox utilizado como referencia. Posteriormente, se determinó de manera preliminar su composición química, haciendo uso de las técnicas cromatográficas para su aislamiento, y de la espectroscopía de RMN para la determinación de su naturaleza química. Los 3 compuestos mayoritarios aislados resultaron ser de naturaleza triterpénica, siendo el daucosterol, ya identificado en las hojas de esta especie vegetal por nuestro grupo, uno de ellos. Una revisión bibliográfica exhaustiva revela que el segundo compuesto, caracterizado como un *dinor*-triterpeno (CGF-8), no ha sido descrito anteriormente en ninguna especie vegetal, incluyendo el género *Crataegus*. Sin embargo, debido a las impurezas, a la fecha no se ha logrado establecer la identidad particular del tercer compuesto, más allá de su naturaleza triterpénica.

Palabras claves: *Crataegus gracilior*, flores, capacidad antioxidante, triterpenos, RMN, daucosterol

SUMMARY

The genus *Crataegus* has approximately 280 species worldwide. In Mexico, 15 species, all known as “hawthorn”, 9 of them endemic, have been identified. One of the most recognized medicinal uses of these plant species is in the treatment of cardiovascular diseases. The chemical composition of some members of the genus has been widely studied in other countries in order to develop standardized extracts. Up to now, the identified compounds have consisted mostly of phenolics and triterpenes. Nowadays, there are in fact various standardized extracts on sale to the public, like the WS® 1442 and the M1330, that regulate blood pressure and heart attack, two of the most growing pathological conditions in the world. In the current study, a methanol extract was obtained from the dried flowers of *C. gracilior*, a plant sample collected in Pinal de Amoles, Querétaro, Mexico. Since the pharmacological activity of some of the secondary metabolites present in *Crataegus* species is exerted partly through its antioxidant capacity, such capacity was assessed, using electrochemical (cyclic voltammetry) and colorimetric (DPPH) methods. By the first method, it was found that the extract has ultimately the same antioxidant capacity than the Trolox used as reference. Some major chemical compounds of the methanol extract were then preliminary determined using combined chromatographic techniques for their isolation, and NMR Spectroscopy for the determination of their respective chemical structures. The 3 isolated, up to now the most abundant, compounds share the triterpenic skeleton, one of which being daucosterol we previously isolated from the leaves. An exhaustive review of the literature reveals that the second compound, a *dinor*-triterpeno (CGF-8), has not been reported in the genus *Crataegus* and in any other plant sample. However, due to impurities, it has not been feasible to establish the complete identity of the third compound (CGF-5).

Keywords: *Crataegus gracilior*, flowers, antioxidant capacity, triterpenes, NMR, daucosterol

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 de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER) por el financiamiento que permitió la culminación de este proyecto.

A mi asesor, el Dr. Moustapha Bah, por aceptarme como su estudiante, por comprenderme, por exigirme y por su esfuerzo en la realización de este proyecto.

A mis sinodales, por el apoyo brindado y por todas las aportaciones valiosas que enriquecieron esta investigación.

A mi compañero, M. en C. Eloy Rodríguez de León por el apoyo en la elucidación estructural de los compuestos obtenidos como resultado de este trabajo.

A mi familia, por siempre creer en mi y alentarme a seguir aun en los momentos donde me sentí más agotada, son una gran motivación.

A Luis, por ser “mi piedrita de oro”, mi apoyo incondicional, por todo el conocimiento y la vida compartida.

A mis amigos y a mis compañeros de laboratorio, por todas las risas que fueron la cereza del pastel en el trayecto a lo largo del proyecto.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	
SUMMARY	
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	4
2.1. Plantas medicinales en la terapéutica.....	4
2.2. Género <i>Crataegus</i>	5
2.2.1. Características botánicas.....	6
2.2.2. Origen, distribución y taxonomía.....	6
2.2.3. Usos tradicionales de las plantas del género <i>Crataegus</i>	8
2.2.4. Composición química del género <i>Crataegus</i>	8
2.3. Bioactividad de los metabolitos secundarios del género <i>Crataegus</i>	11
2.4. Extractos estandarizados.....	13
2.4.1. Extractos estandarizados del género <i>Crataegus</i>	13
2.5. Técnicas de análisis fitoquímico.....	14
2.5.1. Cromatografía.....	15
2.5.1.1. Cromatografía en capa fina.....	15
2.5.1.2. Cromatografía en columna abierta.....	16
2.5.1.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia.....	16
2.5.2. Resonancia magnética nuclear.....	17
2.5.3. Análisis de capacidad antioxidante.....	17
2.5.3.1. Cicloamperometría voltaica.....	18
2.5.3.2. Ensayo DPPH para medir capacidad antioxidante.....	18
3. Justificación.....	19
4. Objetivos.....	20
4.1. General.....	20
4.2. Específicos.....	20
5. Metodología.....	21
5.1. Recolección y conservación del material vegetal.....	21
5.2. Preparación de los extractos.....	21
5.3. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto metanólico.....	21
5.3.1. Método electroquímico (Cicloamperometría voltaica) para la determinación de capacidad antioxidante.....	21
5.3.2. Ensayo DPPH para medir capacidad antioxidante del extracto metanólico.....	23
5.4. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta del extracto metanólico.....	23
5.5. Análisis por cromatografía en capa fina.....	23

5.6. Preparación del revelador sulfato cérico amoniacal.....	24
5.7. Fraccionamiento secundario de la fracción “F90”.....	24
5.8. Purificación de los compuestos por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución.....	24
5.9. Resonancia magnética nuclear.....	25
6. Resultados y discusión.....	26
6.1. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto metanólico.....	26
6.1.1. Método electroquímico (Cicloamperometría voltaica).....	26
6.1.2. Método colorimétrico DPPH.....	27
6.2. Estudios químicos.....	30
6.2.1. Fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta.....	30
6.2.2. Análisis por cromatografía en capa fina.....	30
6.2.3. Fraccionamiento secundario de la fracción “F90”.....	32
6.2.4. Purificación de compuestos por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución.....	33
6.2.5. Determinación de las estructuras de los compuestos mediante RMN... 35	
6.2.5.1. Características estructurales comunes de los compuestos aislados.....	35
6.2.5.2. Características espectrales particulares de los compuestos aislados.....	35
6.2.5.2.1. Compuesto CGF-5.....	36
6.2.5.2.2. Compuesto CGF-8.....	38
6.2.5.2.3. Compuesto CGF-108.....	41
7. Conclusiones.....	46
8. Bibliografía.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografías de flores, frutos, hojas y árbol de una de las especies del género <i>Crataegus</i>	7
Figura 2. Estructuras químicas de los flavonoides representativos del género <i>Crataegus</i>	9
Figura 3. Estructuras químicas de los triterpenos mayoritarios del género <i>Crataegus</i>	10
Figura 4. Estructuras químicas de los ácidos hidroxicinámicos representativos del género <i>Crataegus</i>	10
Figura 5. Frasco y etiqueta del extracto estandarizado comercial denominado M [®] 1330 (Mediherb).....	15
Figura 6. Voltamperogramas de Trolox y extracto metanólico de <i>C. gracilior</i>	28
Figura 7. Comparación de la capacidad antioxidante de Trolox y el extracto metanólico de las flores de <i>C. gracilior</i> por electroquímica.....	29
Figura 8. Relación de las regresiones lineales de los resultados de la capacidad antioxidante del Trolox y del extracto metanólico de las flores de <i>C. gracilior</i> obtenidos por el método DPPH.....	30
Figura 9. Perfil cromatográfico en capa fina de la fracción “F90”.....	32
Figura 10. Perfil cromatográfico en capa fina de la fracción “F90A”.....	33
Figura 11. Cromatograma de la fracción “F90A”.....	34
Figura 12. Espectro de RMN de ¹ H de la muestra CGF-5.....	36
Figura 13. Espectro de RMN de ¹ H de la muestra CGF-5 (región de los 7 CH ₃)....	37
Figura 14. Espectro de RMN de ¹³ C de la muestra CGF-5.....	37
Figura 15. Espectro de RMN de ¹³ C modalidad DEPT de la muestra CGF-5.....	38
Figura 16. Espectro de RMN de ¹³ C completo de la muestra CGF-8.....	39
Figura 17. Espectro de RMN de ¹³ C modalidad DEPT de la muestra CGF-8.....	39
Figura 18. Estructura deducida para el compuesto CGF-8.....	40
Figura 19. Espectro de RMN de ¹ H completo del compuesto CGF-108.....	41
Figura 20. Región de campo bajo del azúcar del compuesto CGF-108.....	42
Figura 21. Espectro de RMN bidimensional ¹ H- ¹ H COSY del compuesto CGF-108.....	42
Figura 22. Espectro de RMN de ¹³ C completo del compuesto CGF-108.....	43
Figura 23. Estructura provisional propuesta para el triterpeno CGF-108.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales compuestos del género <i>Crataegus</i>	12
Tabla 2. Resumen de las condiciones experimentales del fraccionamiento a gran escala del extracto metanólico.....	31
Tabla 3. Grupos de fracciones reunidas y sus rendimientos.....	32
Tabla 4. Resumen de las condiciones experimentales del fraccionamiento secundario por solubilidad.....	33
Tabla 5. Rendimiento de los picos aislados del cromatograma de la muestra "F90A".....	34
Tabla 6. Resumen de las constantes espectroscópicas del compuesto CGF-108.....	44

1. Introducción

El uso medicinal de las plantas tiene su origen desde el inicio de la historia del ser humano sobre la Tierra. Los hechiceros, chamanes y sanadores de los pueblos primitivos tenían conocimiento del uso de las plantas que cohabitaban en las inmediaciones de las aldeas. El compendio *Pen Ts'ao Kang Mu*, que data del año 1596 a.C, es la inscripción más antigua relacionada con el uso de plantas medicinales, en el cual, se puede encontrar una amplia compilación de la preparación y uso de las plantas en la medicina tradicional china (Read, 1936; Pérez *et al.*, 2007).

En la actualidad, los países en vías de desarrollo mantienen el uso de la medicina herbolaria como la alternativa más recurrida para el tratamiento de ciertos padecimientos. Por otra parte, los países desarrollados habían abandonado por casi dos siglos el uso de la medicina tradicional. Hoy en día, las estadísticas revelan la utilización de la medicina herbolaria en estos países ha aumentado en los últimos años. El mercado de la medicina herbolaria en Estados Unidos de América tiene un valor de US\$ 4,600 millones, teniendo un aumento de 1.5% en el 2015, en China el valor del mercado herbolario asciende a US\$ 10,800 millones (Euromonitor, 2016). La variedad de plantas medicinales utilizadas alrededor del mundo es extensa, pues se estima que se han empleado no menos de 70,000 especies en la medicina tradicional de diferentes culturas. Un ejemplo de lo anterior es la Ayurveda (medicina tradicional hindú) que considera el uso de alrededor de 2,000 especies de plantas medicinales (Patwardhan *et al.*, 2004). Así mismo, en la medicina tradicional china, se registra el uso de aproximadamente 57,000 especies (Linares, 2013). Hay que mencionar además que en la medicina convencional se utilizan los productos naturales de aproximadamente 500 plantas medicinales. Por lo tanto, las plantas constituyen una potencial fuente de productos naturales con actividad terapéutica (Patwardhan *et al.*, 2004; Newman y Cragg, 2016). De manera complementaria, la extracción y la purificación de productos naturales han permitido desarrollar extractos estandarizados para la elaboración de fitomedicamentos.

La OMS define a la fitomedicina como “la aplicación de los principios activos de origen vegetal en la terapéutica, basada en el conocimiento científico moderno”. Los extractos estandarizados son un ejemplo de los fitomedicamentos desarrollados en la última década. Algunos ejemplos de extractos estandarizados son: extracto de la raíz de

valeriana (*Valeriana officinalis*), extracto de flores de *Hypericum perforatum* (hierba de San Juan), extracto de hojas de *Ginkgo biloba* (árbol de los cuarenta escudos), extracto de las hojas y flores de diferentes especies de *Crataegus*. La estandarización de un extracto se realiza a partir de uno o varios de sus compuestos bioactivos o mayoritarios que no tengan necesariamente la principal actividad biológica. Tomando en cuenta los ejemplos antes mencionados, los compuestos bioactivos en base a los cuales se realizó la estandarización son valepotriatos y ácido valérico (extracto de Valeriana), hipericina e hiperforina (extracto de *Hypericum*), ginkgólidos (extracto de *Ginkgo*), proantocianidinas (polímeros de catequina), ácido ursólico y ácido crataególico (dos triterpenos) y el flavonoide vitexina (extractos de *Crataegus*) (Morales y Morales, 2015).

“Tejocote” es el nombre común por el cual se conocen indistintamente las plantas del género *Crataegus* en México (Rosaceae). Dicho género se caracteriza por tener árboles espinosos con inflorescencias blancas, hojas verdes y frutos redondos de coloración que varía desde amarillo hasta rojo, dependiendo de la especie (Chang *et al.*, 2002). Se conocen aproximadamente 280 especies del género, divididas en 40 series. Dos terceras partes de las especies se encuentran distribuidas en Asia, Europa y Norteamérica. En México, se han reportado 15 especies, de las cuales, 9 o 10 son endémicas. En México, el estudio taxonómico del género *Crataegus* se llevó a cabo inicialmente por Eggleston en 1909 (Eggleston, 1909). Posteriormente, Phipps realizó los estudios más actuales, haciendo una corrección de la denominación de las especies. En el cual, la especie inicialmente clasificada por Eggleston como *C. pubescens* pasó a denominarse como *Crataegus gracillior* (Phipps, 1997). A pesar de estos trabajos, no se alcanza a determinar la distribución general del género *Crataegus* en México. La falta de estudios taxonómicos del género en los estados de Chiapas, Veracruz, Guerrero, Morelos y Oaxaca deja inconcluso el estudio taxonómico. En general, las especies mexicanas de *Crataegus* se dividen en seis series taxonómicas:

Los constituyentes del género *Crataegus* han sido de amplio estudio, ya que se ha reportado que presentan diversas bioactividades, como antioxidantes, vasorrelajantes y anticancerígenos. Para la especie *C. pinnatifida*, se han elucidado alrededor de 150 constituyentes de diferentes partes de la planta. Los estudios muestran que son las flores y hojas las partes de la planta con mayor contenido de flavonoides. El análisis de la

composición química de las flores revela que presentan flavonoides exclusivos como la vitexina y el ramnósido de vitexina. La presencia de proantocianidinas en flores y hojas ha sido también reportada (Bilia *et al.*, 2007; Hellenbrand *et al.*, 2015). Las proantocianidinas y triterpenos han demostrado tener actividad vasodilatadora. La vasodilatación reduce la resistencia vascular y aumenta el flujo de sangre coronaria, resultando en la disminución de la hipertensión. En la fitoterapia, las proantocianidinas son ampliamente utilizadas en preparados farmacéuticos certificados como fitofármacos (Rigelsky y Sweet, 2002).

2. Antecedentes

2.1. Plantas medicinales en la terapéutica

Desde la antigüedad, las plantas han sido ampliamente reconocidas por su capacidad de mitigar el dolor y hacer frente a varias enfermedades. En el año 3000 a.C, el desarrollo de las civilizaciones egipcias, las de Medio Oriente y las de la India, impulsaron el uso de las plantas para tratar los padecimientos. El escrito más antiguo que registra todo lo relacionado con la medicina herbolaria data del año 1596 a.C, siendo éste el Pen Ts'ao Kang Mu (Read, 1936; Chevallier, 1998). Le sigue el papiro egipcio Ebers (1500 a.C) que registra aproximadamente 800 recetas y hace referencia a 700 productos herbolarios. Así mismo, los egipcios preparaban extractos, licores, infusiones, píldoras, cataplasmas y bálsamos, para lo cual se mezclaban tanto plantas, como materia de origen animal y minerales (Linares, 2013). La medicina tradicional hindú (Ayurveda) describe detalladamente la acción terapéutica de al menos 700 plantas. La medicina Ayurvédica personaliza los remedios, tomando en cuenta como principio básico que *“cada individuo es diferente a otro, por lo cual se debe considerar una entidad diferente. El humano tiene tantas variaciones, como las tiene el universo”*. En la India, la medicina ayurvédica se ha modernizado, por lo que el sistema de salud la ha mantenido vigente, siendo la principal alternativa de tratamiento, por encima de la medicina moderna. Recientemente, se han integrado en la medicina ayurvédica tecnologías modernas de cribado; dichas técnicas han logrado encontrar varios metabolitos secundarios con actividad terapéutica importante como antiartríticos, hepatoprotectores, inmunomoduladores, antimicrobianos, antidiabéticos y antitumorales (Patwardhan *et al.*, 2004). Con relación a la medicina tradicional mexicana, actualmente existen varias organizaciones de médicos tradicionales. Un ejemplo de lo anterior es la Organización de Médicos Indígenas Mayas de la Península de Yucatán (OMIMPY) que fue constituida en 1989. Ésta cuenta con 300 practicantes de medicina tradicional, así como curanderos. Actualmente, los mayas conservan aún profundos rasgos de las antiguas creencias. Así también los *teenek* (Indígenas de origen Huasteco), que mantienen prácticas de medicina tradicional mexicana, teniendo la siguiente filosofía: cada uno de los componentes de la naturaleza se encuentra impregnado de potencias benéficas. Aunado a esto, los curanderos otomíes, junto con médicos de carrera de origen indígena, han creado 5 organizaciones

de medicina tradicional desde 1990. Dichas organizaciones tienen el objetivo de preservar y difundir los conocimientos de la medicina tradicional mexicana (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, 2009). Cabe mencionar que la recolección intensiva de plantas medicinales constituye un gran problema de orden ecológico, dado que puede llevar a la extinción de las especies así, por ejemplo en Roma, las mujeres utilizaban como método anticonceptivo una planta conocida como silfión (planta que pertenecía a la misma familia que la zanahoria), que se extinguió para el siglo III d.C, debido a su difícil cultivo y masiva recolección (Chevallier, 1998).

En la actualidad, se está buscando hacer mayor uso, aunque sustentable, de los productos naturales que presenten actividad terapéutica. Diversos estudios han llevado a la identificación de un gran número de metabolitos secundarios. El estudio de los productos naturales ha sido fundamental para el desarrollo de fitomedicamentos para su uso en la medicina moderna. Algunos metabolitos secundarios utilizados para desarrollar medicamentos incluyen la morfina proveniente de *Papaver somniferum*, la cual tiene actividad relajante, la digoxina extraída de *Digitalis spp.* que se utiliza para enfermedades del miocardio y el taxol que proviene de la corteza del árbol *Taxus brevifolia* y que es un agente quimioterápico con acción antitumoral (Linares, 2013). Así mismo, en las últimas décadas, se han estado utilizando extractos completos estandarizados con actividad biológica, los cuales se encuentran en el mercado (Chang *et al.*, 2002).

2.2. Género *Crataegus*

El género *Crataegus* pertenece a la familia *Rosaceae*. “Tejocote” es el nombre por el cual se conocen indistintamente las plantas del género *Crataegus* en México. La palabra “Tejocote” se deriva del vocablo náhuatl “Texocotl” que significa fruta ácida y dura. En México, desde épocas prehispánicas, se ha utilizado el fruto como fuente alimentaria, como té diurético y como antidiarreico. En la actualidad, se utiliza para preparar una bebida tradicional mexicana hecha a base de frutas hervidas llamada “ponche” (Pérez, 2014). La importancia del tejocote radica en sus propiedades terapéuticas. La medicina tradicional mexicana lo reporta como antitusivo, expectorante y cardioprotector (Jiménez, 2012).

2.2.1. Características botánicas

Las plantas del género *Crataegus* se caracterizan por ser árboles o arbustos pequeños y espinosos, que se desarrollan dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentran. Existen árboles muy desarrollados con un solo tronco y arbustos con ramas en el suelo, como se observa en la Figura 2. Las ramas constan de hojas simples, alternas, romboides-elípticas, con margen acerrado e irregular y con tonalidades verde-oscuro. Las hojas pueden ser de dos tipos: brotes vegetativos y brotes reproductivos. Las flores se presentan en grandes racimos terminales de forma corimbosa, tienen 5 pétalos completos o dentados, expandidos, de color rosado o blanco, como se aprecia en la Figura 1 (Pérez, 2014).

Los frutos generalmente son redondos, pero también se pueden encontrar en forma elipsoide, periforme y pentagonal. El diámetro de los frutos varía desde 5 mm hasta 48 mm. En cuanto a las tonalidades, éstas van de amarillo a rojo brillante, dependiendo de la especie (Nuñez-Colin *et al.*, 2008; Pérez, 2014; Morales y Morales, 2015).

2.2.2. Origen, distribución y taxonomía

Se conocen aproximadamente 280 especies del género divididas en 40 series. A nivel mundial, dos terceras partes de las especies del género *Crataegus* se encuentran distribuidas en Asia, Europa y Norteamérica.

Las plantas del género *Crataegus* son de climas subtropicales a desérticos. En México, se encuentran geográficamente ubicadas en la Sierra Madre Oriental, en el eje Neovolcánico y en zonas montañosas. En nuestro país, existen 15 especies, de las cuales 9 son endémicas. Se distribuyen principalmente al norte y centro del país (Nuñez-Colin *et al.*, 2008; Nuñez-Colin y Hernandez-Martinez, 2011).

Los estudios taxonómicos del género *Crataegus* en México han sido 2. El primero lo realizó Eggleston (Eggleston, 1909) y el segundo se publicó en el año 1997 por el grupo dirigido por Phipps (Phipps, 1997).



Figura 1. Fotografías de flores, frutos, hojas y árbol de una de las especies del género *Crataegus* (Pérez, 2014).

Posteriormente, esos autores descubrieron homonimia de una especie en México denominada como *C. pubescens* por Eggleston con una especie en Europa. En el año 2007, renombraron la especie como *C. gracilior* (Phipps, 2007). Los 2 estudios taxonómicos que se han realizado no toman en cuenta el eco-clima, por lo que se complica la clasificación taxonómica del género. En los estados de Chiapas, Veracruz, Guerrero, Morelos y Oaxaca no se han llevado a cabo estudios taxonómicos del género, lo cual deja inconclusa su clasificación taxonómica en México (Nuñez-Colin *et al.*, 2008). En general, las especies mexicanas del género *Crataegus* se dividen en seis series taxonómicas que se mencionan a continuación: *Mexicaneae* (*C. mexicana*, *C. stipulosa*, *C. nelsoni*), *Crusgalli* (*C. gracilior*, *C. rosei* Egg), *Madresens* Phipps (*C. tracyi*, *C. aurescens* Phipps), *Parvifoliae* (*C. uniflora*), *Greggianeae* (*C. greggiana*, *C. serratisima* Phipps, *C. sulfúrea* Phipps, *C. grandifolia* Phipps), *Baroussaneae* Phipps (*C. baroussana*, *C. cuprina* Phipps, *C. johnstonii* Phipps). Las especies *C. mexicana* y *C. gracilior* Phipps, además de ser endémicas, son las más abundantes en la zona central de México (Nuñez-Colin *et al.*, 2008; Nuñez-Colin y Hernandez-Martinez, 2011).

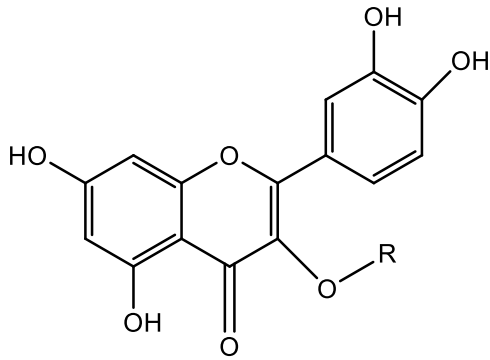
2.2.3. Usos tradicionales de las plantas del género *Crataegus*

En cuanto a los usos tradicionales de las plantas del género *Crataegus*, en México se han empleado todos sus órganos, Así, por ejemplo, la raíz se prepara en infusión con la finalidad de contrarrestar la diarrea y como diurético. También el fruto se prepara en infusión misma que se suministra para tratar la congestión de los bronquios, tratar la tos y además tratar padecimientos del corazón (Jiménez, 2012).

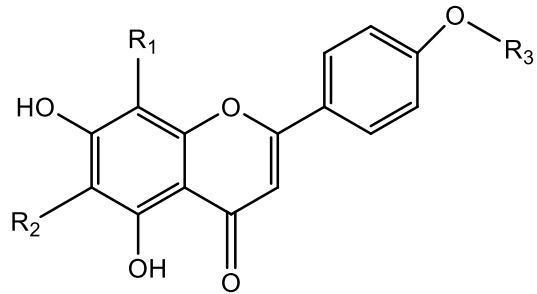
2.2.4. Composición química del género *Crataegus*

Con la finalidad de conocer la composición química de las plantas del género, los primeros estudios químicos se realizaron en el año de 1960. En la actualidad, se han logrado aislar e identificar aproximadamente 150 compuestos diferentes provenientes de las plantas pertenecientes al género *Crataegus*. Algunos de éstos son los flavonoides, los triterpenos, los sesquiterpenos, los lignanos y los ácidos orgánicos (Wu *et al.*, 2014). A continuación, se mencionan los compuestos químicos más abundantes en el género *Crataegus*.

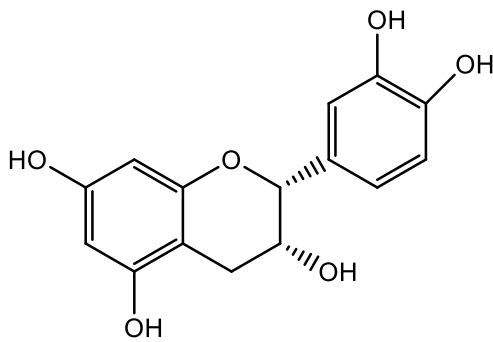
- Flavonoides: Los flavonoides y sus derivados son los metabolitos secundarios más abundantes del género; éstos incluyen flavonas, flavonoles, flavanonas y flavononoles que se han identificado en hojas y flores. Los flavonoides más abundantes registrados son el kaempferol, la quercetina y la rutina. Así mismo, se han encontrado apigenina, luteolina, vitexina, isovitexina, hiperósido de vitexina. En la Figura 2, se muestran las estructuras químicas de los flavonoides representativos del género *Crataegus*. Por su parte, en la Tabla 1, se indican las estructuras químicas de los flavonoides exclusivos de las flores. Los estudios químicos realizados hasta el momento sobre el género *Crataegus* no han mostrado evidencia de la presencia de vitexina en otras partes de la planta que no sean las flores (Wu *et al.*, 2014; Hellenbrand *et al.*, 2015).



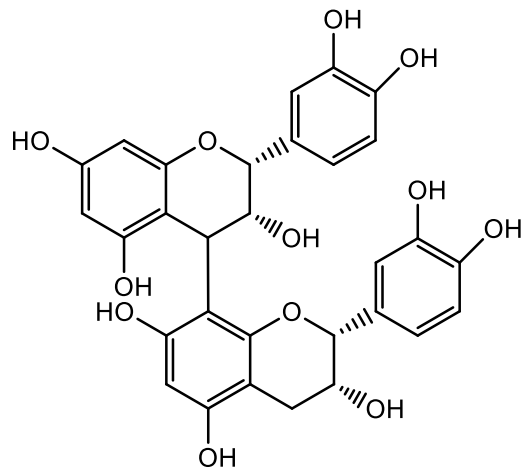
R = H: Quercetina
 R = Ramnosa: Quercitrina
 R = Galactosa: Hiperósido
 R = Glucosilgalactosa: Ritutina



R₁ = Glucosa, R₂ = R₃ = H: vitexina
 R₁ = R₃ = Glucosa, R₂ = H: 4-O-ramnosilvitexina
 R₁ = R₃ = H, R₂ = Glucosa: Isovitexina



(8-)Epicatequina



Proantocianidina B2

Figura 2. Estructuras químicas de los flavonoides representativos del género *Crataegus*.

- Triterpenos:

Los triterpenos del género *Crataegus* están divididos en pentacíclicos y tetracíclicos. Están presentes mayoritariamente en hojas y frutos. Los más representativos son los ácidos ursólico, corosólico, crataególico y oleanólico. Las estructuras químicas de las triterpenos más representativos del género *Crataegus* se muestran en la Figura 3 (Song *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2014).

- Ácidos hidroxicinámicos: Se han encontrado presentes en hojas y frutos. Los ácidos mayoritarios son el clorogénico, el cumárico y el caféico. En la Figura 6 se

muestran las estructuras químicas del ácido caféico y del ácido clorogénico (Wu *et al.*, 2014).

- Ácidos orgánicos: Se han encontrado ácidos orgánicos como el ácido vainílico, el ácido málico, el ácido cítrico, el ácido quínico, el ácido tartárico, el ácido succínico y el ácido esteárico (Wu *et al.*, 2014).
- Compuestos nitrogenados: Únicamente se han encontrado presentes en las hojas. Se han aislado compuestos nitrogenados como la colina, la acetilcolina, la etanolamina y la dimetilamina (Wu *et al.*, 2014).

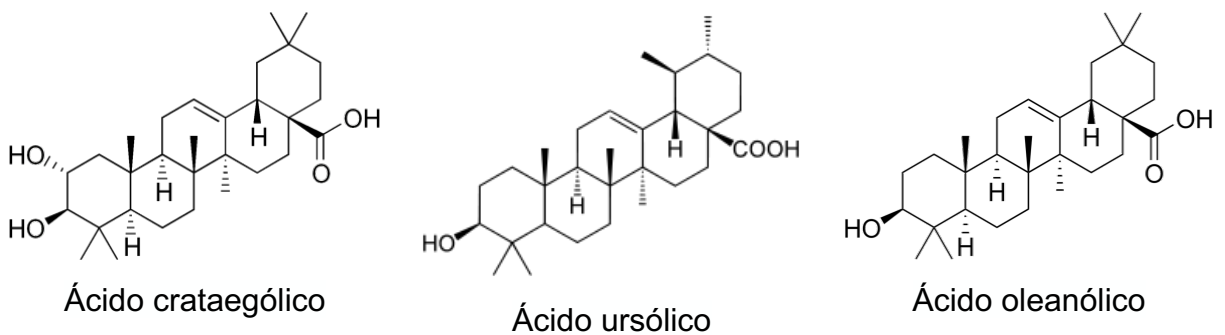


Figura 3. Estructuras químicas de los triterpenos mayoritarios del género *Crataegus*.

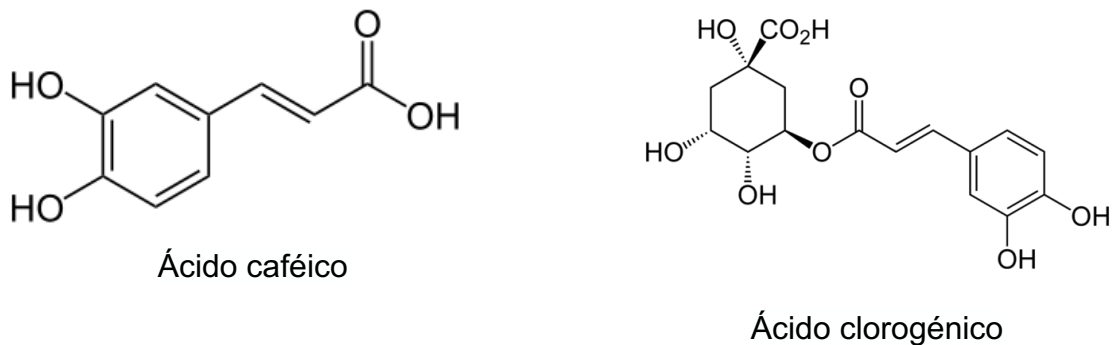


Figura 4. Estructuras químicas de los ácidos hidroxicinámicos representativos del género *Crataegus*.

2.3. Bioactividad de los metabolitos secundarios del género *Crataegus*

Las plantas del género *Crataegus* se han utilizado a lo largo de la historia para tratar diversos padecimientos como son la indigestión, la diarrea y el dolor estomacal. Tienen gran actividad en el sistema cardiovascular y también tienen actividad antioxidante (Popovic-Milenkovic *et al.*, 2014).

Se han realizado cuantiosos estudios de la composición química de diversas especies del género *Crataegus*. Los estudios químicos han permitido tener un panorama más claro respecto a los compuestos presentes en cada parte de la planta. En general, los compuestos se mantienen constantes entre especies. La constante de composición química permite tener una percepción aproximada de lo que se pudiese llegar a encontrar, lo que a su vez permite realizar una predicción respecto a la bioactividad de los metabolitos secundarios presentes. El estudio más reciente de la composición química reporta que los metabolitos secundarios más abundantes presentes en las flores del género *Crataegus* son la vitexina, la 2-O-ramnosil-vitexina, la 8-metoxikaempferol, la pinnatifidina, las proantocianidinas (A2, B2, B4, B5, C1, D1, E1), la epicatequina-(4 β →6)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina y la epicatequina-(4 β →8)-epicatequina -(4 β →6)-epicatequina (Wu *et al.*, 2014).

La vitexina es una flavona glucosilada en su posición 8 que presenta actividades farmacológicas, como antioxidante, cardioprotectora, anticancerígena, antinociceptiva, anticonvulsiva y antidiabética (Aslam *et al.*, 2015).

Se ha demostrado la actividad protectora de la vitexina ante la hipertrofia cardiaca. La hipertrofia cardiaca es causada por el aumento de la masa del miocardio ante un estímulo patológico, lo que provoca una disfunción contráctil que causa falla cardiaca. El estímulo de desarrollo hipertrófico se genera como resultado de la concentración intracelular de Ca²⁺ sostenida que activa a la proteína cinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina (CaMKII). Ésta es un importante modulador del desarrollo de la hipertrofia. La vitexina interrumpe la cascada de señalización que activa la CaMKII, por lo que hay una reversión del proceso hipertrófico cardiaco. Esta propiedad le permite a la vitexina estar clasificada como candidato terapéutico ante la hipertrofia cardiaca y la progresión de falla cardiaca (Cui-Cui *et al.*, 2013). Las proantocianidinas son taninos condensados que se encuentran presentes en las hojas como en las flores del género.

Tabla 1. Principales compuestos del genero *Crataegus*.

Clasificación	Componente químico	Flores	Frutos	Hojas
Flavonoides	• Apigenina			x
	• Luteolina			x
	• Vitexina	x		
	• 2-O-ramnosil-vitexina	x		
	• Crataequinona			x
	• Pinnatifidina			x
	• Kaempferol	x		x
	• 8-metoxikaempferol			x
	• Quercetina	x		
	• Rutina			x
	• (+)-Catequina			
	• (-)-Epicatequina			x
	• Proantocianinas (A ₂ , B ₂ , B ₄ , B ₅ , C ₁ , D ₁ , E ₁)			
Triterpenos	• Ácido ursólico		x	x
	• Ácido corosólico		x	x
	• Ácido maslínico		x	x
	• Betulina			x
Lignanós	• Tortósido			x
	• Verbascósido			x
Ácidos Hidroxicinámicos	• Ácido clorogénico		x	
	• Ácido cumárico		x	
	• Ácido caféico		x	

(Adaptada de Wu *et al.*, 2014. *Molecules* 19, 1685-1712.)

Se pueden encontrar en forma de dímeros y de polímeros. Presentan actividad terapéutica antiviral, antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, antiarterosclerótica y cardioprotectora. Existe una relación entre el grado de polimerización de estos flavonoides y la actividad terapéutica. Estos flavonoides modulan enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, además de ser excelentes agentes quelantes (Mateos, 2013). Los taninos condensados presentan actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA). Lo que resulta en un efecto hipotensor, debido a que se interrumpe

la transformación de angiotensina I a angiotensina II. La angiotensina II se une al receptor membranal 5HT_{1A}, provocando que se inicie una vía de señalización que genera la constricción vascular y aumenta así la presión sanguínea. Al inhibirse la ECA se modula la presión arterial (Caballero-George *et al.*, 2002).

2.4. Extractos estandarizados

La fitomedicina se define como la aplicación de principios activos de origen vegetal en la terapéutica, basándose en el conocimiento científico. La fitomedicina se apoya de la fitoquímica, la farmacología y la terapéutica moderna para llegar al desarrollo de un fitomedicamento. La fitofarmacología es la rama de la farmacología que se enfoca al estudio de los extractos estandarizados de plantas medicinales (Chang *et al.*, 2002). Los extractos estandarizados son extractos de alta calidad que contienen niveles consistentes de compuestos específicos. Las plantas medicinales que se utilizan para desarrollar los extractos estandarizados son sometidas a rigurosos controles de calidad a lo largo de su crecimiento, cosecha y manufactura. Dichos extractos también se conocen como fitomedicamentos. Los fitomedicamentos juegan un papel relevante en la terapéutica moderna. Son usados tanto para la prevención, como para el tratamiento de padecimientos. Los extractos estandarizados pueden estar hechos a base de la planta completa o solo de ciertas partes de la misma (Kunle *et al.*, 2012).

2.4.1. Extractos estandarizados del género *Crataegus*

Los estudios químicos del género *Crataegus* se han centrado en la identificación de compuestos fenólicos, entre ellos los flavonoides, así como de terpenoides. La presencia de estos compuestos justifica la actividad farmacológica reportada con relación al género. Los efectos benéficos se atribuyen a los principales constituyentes activos, siendo éstos los flavonoides (vitexina y proantocianidinas). Las especies del género *Crataegus* se utilizan en Europa y Asia por su actividad terapéutica como antioxidantes, anti-inflamatorios, hipolipidémicos e hipotensores, así como contra padecimientos de indigestión y tensión abdominal (García-Mateos *et al.*, 2012).

Los extractos estandarizados del género *Crataegus* son generalmente etanólicos. Las partes de la planta que se utilizan pueden ser la misma o de diferente especie, la misma

parte de la planta de diversas especies o diferentes partes de la planta de la misma especie. De acuerdo con la Farmacopea Europea, los extractos estandarizados consisten en las hojas y flores de *C. monogyna*, *C. laevitagata*, *C. pentagyna*, *C. nigra* y *C. azarolus*. Los compuestos bioactivos que se utilizan como marcadores de los extractos estandarizados son los siguientes: vitexina, rutina, 2-O-ramnosil-vitexina, catequina, epicatequina y proantocianidinas, todos los cuales son flavonoides. El extracto estandarizado aprobado por la farmacopea europea se conoce como WS[®] 1442 (extracto etanólico al 45%). Los extractos acuosos contienen únicamente un 2.5% de flavonoides, mientras que los extractos hidroalcohólicos mantienen niveles de 6% de flavonoides (Koch y Abdul, 2011). La farmacopea europea indica que los extractos estandarizados de *Crataegus* deben estar conformados por flores y hojas, pues estas partes de la planta tienen alto contenido de flavonoides (proantocianidinas y vitexina).

En la Figura 5, se muestra la etiqueta de otro extracto estandarizado comercial conocido como M[®]1330. En este fármaco, manufacturado y comercializado por la empresa australiana Mediherb, se utilizan la 2-O-ramnosil-vitexina y polímeros de catequina (proantocianidinas) como marcadores (Mediherb).

2.5. Técnicas de análisis fitoquímico

Las técnicas de análisis químico permiten separar, identificar y determinar la composición química relativa de los extractos. En conjunto, permiten la elucidación estructural de las especies químicas que componen el extracto. Se hicieron uso de técnicas que permitieron separar, purificar e identificar los metabolitos secundarios presentes en las flores de *C. gracillior*. El proceso desde el aislamiento hasta la elucidación estructural de cada producto natural es diferente, pues no hay una metodología estandarizada para hacerlo ya que cada planta es diferente. A continuación, se presentan las técnicas de las cuales empleadas en este proyecto para poder llegar al objetivo del mismo.



Supplement Facts		
Serving size:	1 tablet	
Servings per container:	40	
Amount per Serving		%DV
Calories	2	
Calcium	60 mg	6%
Hawthorn herb flowering top 3:1 extract from <i>Crataegus monogyna</i> herb flowering top 1.0 g	334 mg	†
Containing vitexin-2-rhamnoside and catechin polymers	6.01 mg and 15 mg	
† Daily Value (DV) not established.		
Other ingredients: Calcium acid phosphate, cellulose, hypromellose, magnesium stearate and sodium starch glycolate.		
Caution: Not to be used during pregnancy and lactation unless otherwise directed by a qualified health care professional.		
Product No	Content	
M1330	40 Tablets	

Figura 5. Frasco y etiqueta del extracto estandarizado comercial denominado M[®]1330 (Mediherb).

2.5.1. Cromatografía

Los extractos crudos contienen una mezcla compleja de compuestos, por lo que es necesario el fraccionamiento del mismo. La técnica más utilizada para realizar el fraccionamiento es la cromatografía. Se inicia con el fraccionamiento del extracto, donde las fracciones que tengan compuestos con polaridades similares se agrupan por efecto del uso de un gradiente de elución. No es recomendable realizar muchas fracciones del extracto crudo, puesto que se hace más difícil encontrar el compuesto o los compuestos de interés. Las fracciones obtenidas se someten a diferentes técnicas cromatográficas como la cromatografía planar (en capa fina principalmente), la cromatografía en columna y la cromatografía líquida de alta eficiencia (Sarker y Nahar, 2012). A continuación, se mencionan las técnicas cromatográficas que se utilizaron en el proyecto.

2.5.1.1. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina (CCF) es la cromatografía planar más utilizada para el aislamiento de productos naturales. Se utiliza para la separación de compuestos orgánicos en mezclas complejas. En la actualidad, la CCF tiene una importancia central

en el aislamiento y análisis de productos naturales, ya que es una técnica sencilla, barata y eficiente para la separación de los mismos. La separación se lleva a cabo por medio de capas finas adsorbentes que recubren placas de diferentes materiales como son el vidrio, el plástico y el aluminio.

2.5.1.2. Cromatografía en columna abierta

La cromatografía en columna abierta (CCA) fue muy utilizada como método principal de fraccionamiento en los años 70's. La CCA se basa en la elución por gravedad a través de la columna. La columna se empaca con una fase estacionaria generalmente de gel de sílice por el que se deja eluir la fase móvil de elección. Es importante tomar en cuenta el tamaño de partícula de la fase estacionaria. Se recomienda que ésta sea mayor a 60 μm . Cuando el tamaño de partícula es menor a 60 μm , el flujo de la elución de la columna disminuye ya que la presión dentro de ésta aumenta. Conservar una reserva de solvente en la parte superior de la columna aumenta la eficiencia de la misma y mantiene un flujo constante. El flujo de la columna se regula con la válvula de salida (Sarker y Nahar, 2012).

2.5.1.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia

La técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) es la preferida para el análisis de productos naturales. El análisis de productos naturales siempre representa un reto, pues se presentan en una compleja mezcla de compuestos, además de que la cantidad en la que se presentan es muy escasa. La cromatografía de líquidos de alta eficiencia es una técnica selectiva y sensible. Se utilizan diversos tipos de detectores como los de fluorescencia, los de UV-Visible, ya sean programables a una o dos longitudes de onda, o los de arreglo de diodos, así como los de masas. Los detectores permiten diferenciar las especies químicas que se están analizando. Es una técnica muy versátil que brinda una amplia gama de selección de fases que dependen de la mezcla de compuestos que se tengan. Así mismo, permite una mejor resolución entre compuestos a diferencia de otras técnicas. El tamaño de distribución de partícula va desde 10 μm hasta 3 μm permitiendo una mejor separación de compuestos (Sarker *et al.*, 2006).

2.5.2. Resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica analítica basada en las propiedades magnéticas de los núcleos de los átomos de las muestras. Es una técnica de vital importancia en el análisis de productos naturales, ya que se utiliza para determinar la estructura molecular de especies químicas. Los productos naturales están constituidos de moléculas de carbono, de hidrogeno, de oxígeno y de nitrógeno. Todos estos elementos tienen isótopos que son magnéticamente detectables por RMN. Para que un átomo sea detectado por RMN, éste debe tener un momento magnético diferente a cero. Un beneficio de esta técnica es que no es destructiva, por lo que es posible recuperar la muestra posteriormente al análisis (Ratcliffe *et al.*, 2001).

2.5.3. Análisis de capacidad antioxidante

Se define como antioxidante a cualquier sustancia o acción que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula diana. En las últimas décadas, los antioxidantes han sido gran objeto de investigación en el área de ciencias de la salud. Los antioxidantes tienen un potencial efecto positivo en la prevención de enfermedades crónicas degenerativas y el envejecimiento. Estas propiedades se atribuyen a la facilidad de unión con los radicales libres en el cuerpo que surgen como resultado del estrés oxidativo (Wu *et al.*, 2006).

Los productos naturales derivados de las plantas como son los flavonoides han demostrado tener actividad antioxidante que permite a la planta preservarse a lo largo de su crecimiento. Los flavonoides son una amplia familia de compuestos polifenólicos con grupos hidroxilos por los cuales se les confiere actividad antioxidante. Las propiedades químicas, en términos de la disponibilidad de donación de hidrógenos de los compuestos fenólicos, pueden ayudar a predecir la capacidad antioxidante de un compuesto (Rice-Evans *et al.*, 1995).

Existen diversos métodos para determinar la capacidad antioxidante de un compuesto. En este estudio, se utilizó un método convencional *in vitro* (DPPH) y uno electroquímico específicamente el método CUPRAC por sus siglas en inglés (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) (Cárdenas *et al.*, 2014). Este último permite medir la capacidad

antioxidante no sólo de compuestos fenólicos, además de una amplia gama de compuestos, incluyendo los que carecen de los sistemas conjugados como son los azúcares, los terpenoides, los ácidos grasos saturados e insaturados.

2.5.3.1. Voltametría cíclica (CUPRAC)

La voltametría cíclica es uno de los métodos más apropiados para medir la capacidad antioxidante de moléculas de bajo peso molecular, así como de extractos herbáceos. En concreto, el método se fundamenta en la medida de la capacidad reductora de un analito, lo cual indica su habilidad para donar electrones. De esta manera, la capacidad antioxidante de un analito es directamente proporcional a su capacidad reductora (Chevion *et al.*, 1999).

Por otra parte, se puede identificar el mecanismo antioxidante de un analito conociendo su comportamiento electroquímico a través de las técnicas voltamétricas (Turdean *et al.*, 2016). El potencial 'Eox' y la intensidad de corriente anódica 'Ia', son los parámetros que permiten determinar la capacidad antioxidante total en el ensayo de voltametría cíclica. Así, el potencial se relaciona con la capacidad reductora específica de cada compuesto presente en la muestra. La intensidad de corriente está relacionada con la concentración de componentes reductores en la muestra. La integración de estos parámetros resulta en un valor equivalente a la capacidad antioxidante total de la muestra (Kilmartin *et al.*, 2001).

2.5.3.2. Ensayo DPPH para medir capacidad antioxidante

El ensayo de DPPH se basa en la medición de la capacidad de la muestra de reducir el radical sintético colorido 1,1-difenil-2-picrilhidracilo, también conocido como DPPH. El DPPH muestra una coloración inicial purpura, que al contacto con la muestra resulta en una pérdida de coloración. La reacción es monitoreada por espectrofotometría a una $\lambda=515$ nm. Los resultados se expresan como equivalentes Trolox (TEAC) (Morales, 2012).

3. Justificación

En la actualidad, existe un creciente interés por el estudio de productos naturales con actividad biológica hacia dianas específicas, que estén relacionadas con las principales enfermedades que afectan al mundo. Las enfermedades cardiovasculares en sus diferentes manifestaciones, reconocidas por la OMS como silenciosas, son de rápida expansión y causan el mayor número de víctimas fatales, inclusive en México. Los esquemas actuales del tratamiento convencional de las enfermedades cardiovasculares presentan serios efectos adversos, además de ser solo accesibles a cierto sector de la población, debido en muchas ocasiones a su alto costo. Por esta razón, resulta importante considerar la medicina tradicional, de la cual pueden obtenerse fitomedicamentos que sean de acceso universal para la prevención, la rehabilitación y la cura de esos padecimientos. La fase primordial para obtener un fitomedicamento es el conocimiento de los principales constituyentes químicos de las plantas con uso tradicional. Hojas, flores y frutos de diversas especies del género *Crataegus* con reputación en la medicina tradicional se han utilizado para obtener extractos estandarizados en Asia y Europa. Dichos preparados se encuentran entre las alternativas de elección para tratar los padecimientos cardiovasculares, debido a su eficacia, inocuidad y su relativo bajo costo. La composición química de las flores del género *Crataegus* está constituida por un alto porcentaje de flavonoides, siendo algunos de ellos exclusivos de esos órganos, haciendo que sean por lo tanto utilizados para desarrollar extractos estandarizados. *C. gracilior* es una especie endémica de México con uso tradicional para tratar diversas enfermedades, entre ellas, las cardiovasculares. De esta especie, se desconoce la composición química de las flores. Es por esta razón que este proyecto estuvo enfocado a realizar el estudio químico de los constituyentes presentes en las flores de dicha especie, condición indispensable para un futuro desarrollo de un fitomedicamento basado en esta planta. Además, se llevó a cabo la determinación de la capacidad antioxidante del extracto metanólico, debido a que parte de las actividades de esos extractos pudiera estar mediada por su capacidad antioxidante.

4. Objetivos

4.1. General

Evaluar la capacidad antioxidante y determinar, de manera preliminar, los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto metanólico de las flores de *Crataegus gracilior*.

4.1.1. Específicos

1. Obtener el extracto metanólico de las flores de *C. gracilior* mediante maceración.
2. Evaluar la capacidad antioxidante del extracto metanólico de las flores de *C. gracilior* mediante diferentes métodos.
3. Obtener las fracciones y compuestos purificados de los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto metanólico de las flores de *C. gracilior* mediante métodos cromatográficos.
4. Identificar mediante RMN la naturaleza química de los componentes mayoritarios del extracto metanólico de las flores de *C. gracilior*.

5. Metodología

5.1. Recolección y conservación del material vegetal

Se recolectaron las flores de *C. gracilior* en mayo de 2015 en el Municipio de Pinal de Amoles, Querétaro (México). La colecta e identificación taxonómica fue realizada por el M. en C. Alejandro Cabrera. Una muestra de identificación (A. Cabrera 5668) fue depositada en el herbario "Jerzy Rzedowski" (QMEX) ubicado en la Facultad de Ciencias Naturales, UAQ, Campus Juriquilla. Las flores fueron sometidas a un proceso de secado en una estufa a 40° C. Con el propósito de obtener un material fino homogeneizado y hacer más eficiente la extracción, las flores secas (1 kg aproximadamente) se fragmentaron con un molino manual.

5.2. Preparación de los extractos

Para obtener los compuestos presentes en las flores de *C. gracilior*, el material molido fue macerado utilizando de manera sucesiva los siguientes disolventes: hexano, diclorometano, acetona, metanol y agua. El tiempo de maceración del material vegetal con cada solvente fue de 1 semana, con agitación manual ocasional. Al finalizar cada maceración, se filtró el extracto y se llevó a sequedad con presión reducida en un rotaevaporador usando temperaturas máximas de 40° C.

5.3. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto metanólico.

Para determinar la capacidad antioxidante del extracto metanólico de las flores de *C. gracilior*, se hizo uso de 2 técnicas con fundamentos diferentes, debido a que los métodos tradicionales colorimétricos presentan discrepancias entre los resultados de una misma muestra.

5.3.1. Método electroquímico (cicloamperometría voltaica) para la determinación de capacidad antioxidante

Con el propósito de determinar la capacidad antioxidante, se prepararon las siguientes soluciones: $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.001 M en agua destilada, neocuproína 0.0075 M en etanol, buffer pH 7.0 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$).

Para preparar las alícuotas, se mezcló 1 mL de cada una de las soluciones listadas anteriormente. Con la finalidad de realizar la curva estándar, se añadió a la solución 1 mL de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (1×10^{-4} M, 2×10^{-4} M, 4×10^{-4} M, 6×10^{-4} M, 8×10^{-4} M). Posteriormente, se prepararon diferentes concentraciones (2×10^{-4} g, 4×10^{-4} g, 6×10^{-4} g, 8×10^{-4} g/mL de etanol) del extracto metanólico de las flores de *C. gracilior*. Para llevar a cabo la evaluación, se mezclaron 1 mL de la solución acuosa de $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.001 M, 1 mL de la solución de neocuproína 0.0075 M en etanol, 1 mL de buffer, 1 mL de agua destilada y 1 mL de solución del extracto metanólico.

Las mediciones se realizaron en una celda de 3 electrodos, para la cual se utilizó un electrodo de referencia Calomel $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$, KCl (1 M), un electrodo de trabajo de carbón vítreo y un contra electrodo de grafito. Para garantizar el desempeño efectivo del electrodo de trabajo, previo a cada medición, se pulió el electrodo con polvo de alúmina seguido de ultrasonido durante 10 min. El proceso se realizó por triplicado.

La velocidad de barrido para el ensayo fue de 100 mVs^{-1} y en el voltograma, se registraron los picos anódicos. La primera lectura se llevó a cabo con 100 mV, las subsecuentes con 120 mV para así poder registrar los procesos de óxido-reducción subsecuentes.

Brevemente, la reacción se inicia con la adición de las soluciones en el orden previamente mencionado, que permite inicialmente la formación del complejo cobre-neocuproína $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}$, el cual es reducido a $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$ al adicionar el antioxidante a la reacción. Con el inicio de la voltametría, se oxida el complejo cobre-neocuproína de $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$ a $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}$. En este proceso, el pico de la corriente de oxidación está directamente relacionado con la concentración de $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$, ya que, al existir mayor cantidad del complejo reducido en el electrolito, la cantidad de moléculas oxidadas del complejo $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}$ es mayor. Lo anterior determina de manera indirecta la capacidad antioxidante del analito; pues a una mayor capacidad antioxidante existe una mayor concentración del complejo cobre neocuproína $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}$ reducido a $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$ con la adición inicial del antioxidante.

Por otro lado, hay que tomar en cuenta que el potencial de oxidación del complejo cobre-neocuproína ($[\text{Cu}/(\text{Nc})_2]^{2+}/[\text{Cu}/(\text{Nc})_2]^+$) formado en la reacción de óxido-reducción no es

lo suficientemente alto como para promover la oxidación de azúcares, por lo que no se considera que pudiera ser una interferencia.

5.3.2. Ensayo de DPPH para medir capacidad antioxidante del extracto metanólico

Para determinar la capacidad antioxidante por medio del método colorimétrico tradicional DPPH, se preparó una solución de ácido ascórbico al 25% v/v adicionando metanol al 80% (se mantuvo en la obscuridad para evitar su descomposición). Dicha solución se utilizó para hacer la curva de calibración. El reactivo DPPH se preparó de la siguiente manera: se pesaron 3.9 mg del reactivo DPPH y se aforó a 100 mL con una solución de metanol al 80% (se mantuvo en la obscuridad). Una vez preparado el reactivo DPPH, se sometió a sonicación durante 10 min. Se mezcló una alícuota de 2.9 mL de la solución de DPPH con 2 mL de la solución de la muestra y se dejó reaccionar por 30 min. Para obtener los resultados, se midió la absorbancia de la solución en un espectrofotómetro a 517 nm. Los resultados se reportaron en mEq de ácido ascórbico.

5.4. Fraccionamiento a gran escala por cromatografía en columna abierta del extracto metanólico

Inicialmente, se adsorbieron 7.3 g del extracto metanólico en gel de sílice (Kiesegel 60 Merk malla de 70-230, tamaño de partícula 0.063–0.200 mm). La muestra adsorbida seca se colocó posteriormente en la parte superior de una columna cromatográfica empacada previamente con la misma fase estacionaria. Las dimensiones de la columna empleada fueron de 10 cm de diámetro por 110 cm de alto. Para la elución de la columna, se utilizó inicialmente hexano como fase móvil. Después, la elución se continuó haciendo un gradiente creciente de polaridad, así como de proporciones. En concreto, los solventes que se emplearon para constituir la fase móvil fueron hexano, diclorometano, acetona y metanol. Al finalizar el fraccionamiento con metanol, se obtuvieron 237 fracciones.

5.5. Análisis por cromatografía en capa fina “CCF”

La cromatografía en capa fina se realizó con el objetivo de analizar los perfiles cromatográficos de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna abierta. Para lo anterior, se utilizaron cromatofolios recubiertos con gel de sílice (silica gel 60

GF₂₅₄ Merck) con revelador foto sensible. Para visualizar los compuestos, se utilizó una lámpara de radiación ultravioleta de onda corta (254 nm) y de onda larga (365 nm). Así mismo, se utilizó como revelador sulfato cérico (IV) amoniacal en una solución de H₂SO₄/H₂O.

5.6. Preparación del revelador sulfato cérico amoniacal

A 300 g de hielo (agua tridestilada), se adicionaron 12 g de sulfato cérico amoniacal [(NH₄)Ce(SO₄)] y lentamente y con agitación, 22.5 mL de ácido sulfúrico concentrado, hasta que se formó una solución homogénea, la cual fue directamente utilizada para revelar las placas.

5.7. Fraccionamiento secundario de la fracción “F90”

Como resultado del monitoreo de la CCF, se obtuvieron varios grupos de fracciones con el mismo perfil cromatográfico, dentro de los cuales se eligió un grupo denominado “F90”, al que se realizó un fraccionamiento secundario haciendo lavados consecutivos con los solventes hexano (“F90D”), diclorometano (“F90C”), acetona (“F90B”) y metanol (“F90A”). Posteriormente, se analizaron las nuevas fracciones por cromatografía en capa fina y, con base en los perfiles cromatográficos obtenidos, se eligió trabajar con la fracción “F90A” para su posterior análisis.

5.8. Purificación de los compuestos por medio de cromatografía de líquidos de alta eficiencia de la fracción “F90A”

Con la finalidad de purificar los compuestos presentes en la fracción “F90A”, se llevaron a cabo varios análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con el fin de determinar las condiciones óptimas de separación. Como resultado, se obtuvieron las siguientes condiciones: fase móvil: 95:5 CH₃CN:MeOH, fase estacionaria: Eclipse XBD-C18 (3.5 µm, 4.6 x 150 mm) y un flujo isocrático de 0.25 mL/min. Posteriormente, se extrapolaron las condiciones a cromatografía de líquidos de alta resolución a nivel preparativo, utilizando como fase móvil: 95:5 CH₃CN:MeOH, como fase estacionaria una columna Zorbax Eclipse XBD-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5 µm), con un flujo de 1 mL/min. Con el propósito de separar los componentes la muestra “F90A”, se realizaron varias

inyecciones en cromatografía de líquidos de alta resolución a nivel preparativo, para lo cual se realizó la colecta individual de los picos que se registraron en el cromatograma.

5.9. Resonancia Magnética Nuclear

Para determinar la naturaleza de los compuestos mayoritarios aislados de la muestra "F90A", se obtuvieron los espectros de RMN unidimensionales (^1H y ^{13}C) y bidimensionales homonucleares ^1H - ^1H COSY y heteronucleares ^1H - ^{13}C . Estos últimos incluyeron las modalidades HMQC (de sus siglas en inglés: **H**eteronucler **M**ultiple **Q**uantum **C**oherence, o su equivalente HSQC: **H**eteronucler **S**ingle **Q**uantum **C**oherence) y HMBC (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation). Así mismo, para determinar el grado de sustitución en los carbonos (CH_3 , CH_2 , CH o cuaternarios), se realizó el experimento DEPT (del inglés: **D**istortionless **E**nhancement by **P**olarization **T**ransfert). Los espectros se registraron en un equipo Brücker de 500 MHz ubicado en el Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Fisicoquímicas y Estructura Molecular (LACAPFEM) de la Universidad de Guanajuato. Todas las muestras fueron disueltas en DMSO-D_6 .

6. Resultados y discusión

6.1. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto metanólico

Con el fin de determinar la capacidad antioxidante del extracto metanólico de las flores de *C. gracilior* de manera más certera, se realizaron 2 técnicas diferentes.

6.1.1. Método electroquímico (cicloamperometría voltaica)

Para determinar la capacidad antioxidante total de un extracto, el método CUPRAC es el más adecuado debido a las limitantes técnicas de los métodos colorimétricos.

En la Figura 6, tanto en A como en B, se observan los voltagramas `ii` característicos de soluciones del ensayo CUPRAC, donde no existe pico de corriente de oxidación una vez que se realiza una exploración voltamétrica hacia valores positivos. No obstante, se encuentra presente el pico de la corriente de reducción (I_r) correspondiente a la reducción del complejo $[Cu(Nc)_2]^{2+}$ a $[Cu(Nc)_2]^+$. Ahora bien, en la Figura 6A, se exhiben los voltagramas registrados (iii-vi) de la adición de las diferentes concentraciones de Trolox (1×10^{-4} M, 2×10^{-4} M, 4×10^{-4} M, 6×10^{-4} M, 8×10^{-4} M). Como resultado del aumento en las concentraciones de Trolox, se presenta la tendencia que sugiere que la concentración está directamente relacionada con la corriente de oxidación. Con respecto al potencial, inicialmente el voltagrama de las soluciones CUPRAC que no contiene Trolox, se registra en 0.455 V. Sin embargo, a medida que se aumenta la concentración de Trolox en el electrolito, el potencial inicial se desplaza a valores más negativos, llegando hasta 0.40 V. Lo anterior está relacionado con la capacidad del agente antioxidante de donar electrones, por lo que existe mayor concentración del complejo reducido $[Cu(Nc)_2]^+$.

Por otro lado, en la misma Figura 6B, se muestran los voltagramas resultantes de las diferentes concentraciones (2×10^{-4} g, 4×10^{-4} g, 6×10^{-4} g, 8×10^{-4} g) del extracto metanólico de las flores de *C. gracilior*.

En concordancia con la tendencia de aumento de corriente en los picos de oxidación en los voltagramas del Trolox, la corriente de los picos de oxidación en los voltagramas del extracto metanólico de las flores de *C. gracilior* también aumenta. Por lo anterior, se infiere que la concentración del extracto está directamente relacionada con la corriente de los picos de oxidación de los voltagramas.

Con respecto al potencial inicial de los voltogramas del extracto se registró en 0.455 V, que de igual manera que los voltogramas de Trolox, a medida que se aumenta la concentración del extracto, el potencial se desplaza a valores más negativos.

Los datos obtenidos de los picos de la corriente máxima de oxidación fueron ajustados a una función lineal. En la Figura 7, se muestra el aumento de la corriente del pico de oxidación, la cual está directamente relacionada con la concentración del antioxidante presente en la solución. No obstante, cabe señalar que el potencial inicial registrado en el voltograma del extracto metanólico de concentración que contenía 8×10^{-4} g, se encuentra en valores más negativos, específicamente en 0.47 V con respecto al potencial inicial registrado en el voltograma de Trolox 8×10^{-4} M que se encuentra en 0.40 V. Lo anterior sugiere que el extracto metanólico pudiera tener mejor actividad antioxidante que el Trolox, ya que el potencial está directamente relacionado con la capacidad del analito de donar electrones.

Así mismo, se realizó una regresión lineal entre la corriente de oxidación máxima registrada y la concentración tanto de Trolox como del extracto metanólico. En la Figura 7, se muestra la tendencia ascendente de la corriente de oxidación resultante de la adición de Trolox y del extracto metanólico. Como se ha dicho con anterioridad, la gráfica en la Figura 7 presenta la relación que existe entre la corriente de oxidación y la concentración.

6.1.2. Método colorimétrico DPPH

Para determinar la capacidad antioxidante mediante métodos colorimétricos, se utilizó el ensayo DPPH. Para lo anterior, se empleó como estándar de referencia el Trolox. Como resultado, se obtuvieron los datos que se presentan como una recta en la Figura 8. Así mismo, se muestran los datos en forma de regresión lineal que se obtuvieron de las diferentes concentraciones del extracto metanólico de las flores de *C. gracilior*. En definitiva, la tendencia tanto de la absorbancia de la curva del Trolox como de la curva del extracto metanólico es que disminuye a medida que la concentración del antioxidante aumenta. Lo anterior se debe a que la concentración del radical libre DPPH en la solución disminuye a causa de su reducción por el antioxidante.

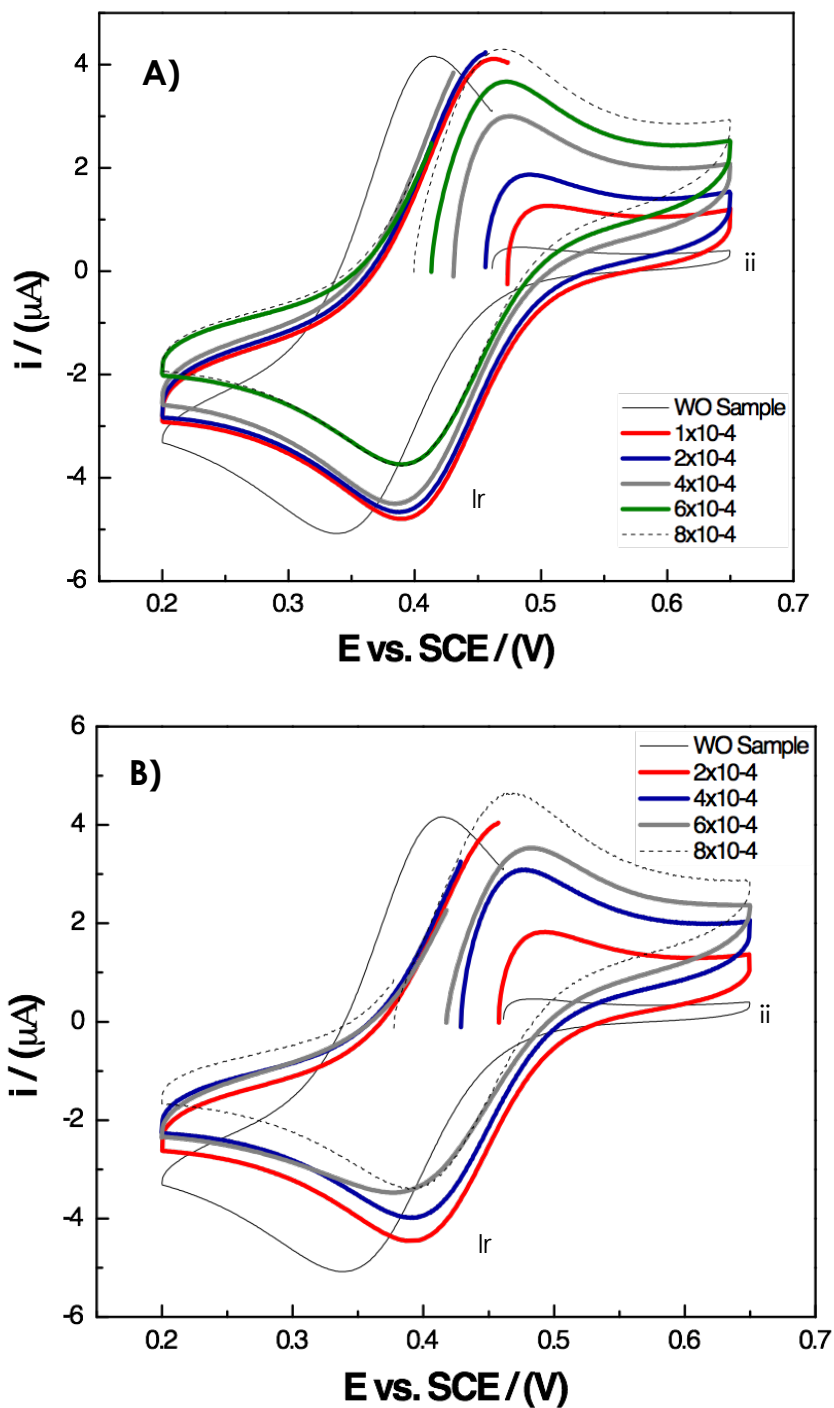


Figura 6. Voltamperogramas de Trolox y extracto metanólico de *C. gracilior*. **A)** Trolox, estándar de referencia: $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$, KCl (1M), contraelectrodo de grafito y electrodo de trabajo de carbón vítreo (3 mm de diámetro). Rango de 100 mV. **B)** Extracto metanólico de las flores de *C. gracilior*, estándar de referencia: $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$, KCl (1M), contraelectrodo de grafito y electrodo de trabajo de carbón vítreo (3 mm de diámetro). Rango de 100 mV.

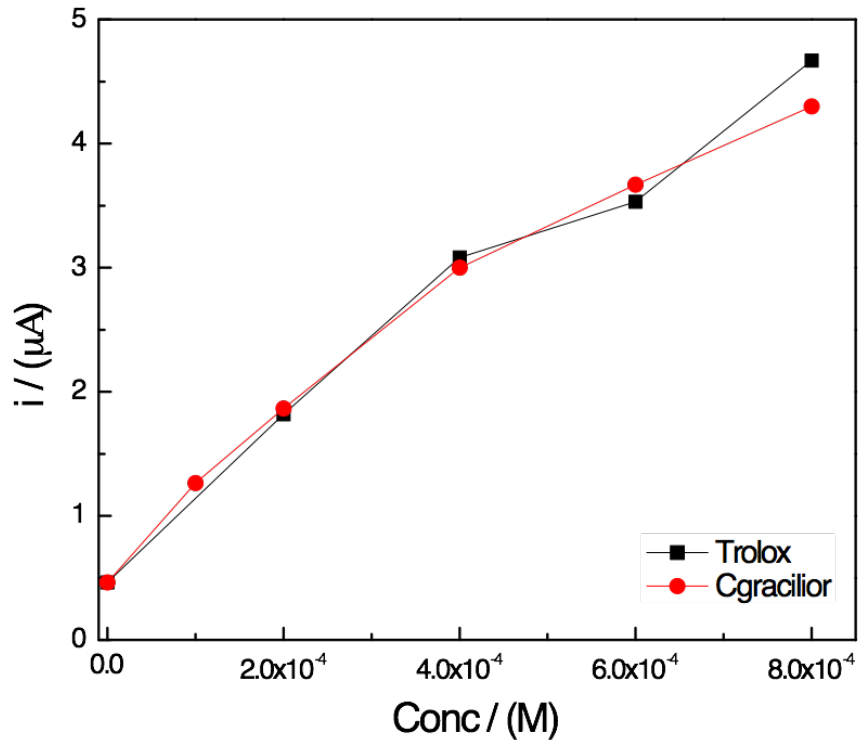


Figura 7. Comparación de la capacidad antioxidante de Trolox y el extracto metanólico de las flores de *C. gracilior* por electroquímica. Regresión lineal entre la corriente de los picos de oxidación de $[\text{Cu}/(\text{Nc})_2]^+$ (concentración del oxidante) para Trolox y para el extracto metanólico de las flores de *C. gracilior* (del orden de 10^{-4} g/mL de etanol).

El comportamiento se repite con la adición de la muestra del extracto metanólico de *C. gracilior*, por lo que se puede inferir que tiene capacidad antioxidante.

Por otra parte, claramente en la Figura 8, se observa que a la máxima concentración de Trolox (8×10^{-4} M), la absorbancia es aproximadamente de cero. En contraste, a la mayor concentración del extracto metanólico (8×10^{-4} g/mL de etanol), la absorbancia disminuye hasta un máximo de 0.5, Por lo que se puede inferir que la capacidad antioxidante del extracto es menor que la del Trolox.

6.2. Estudios químicos

6.2.1. Fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta

De la cromatografía en columna abierta, se obtuvieron 237 fracciones. En la Tabla 2 se registran las condiciones utilizadas para eluir cada fracción y algunos pesos de las mismas.

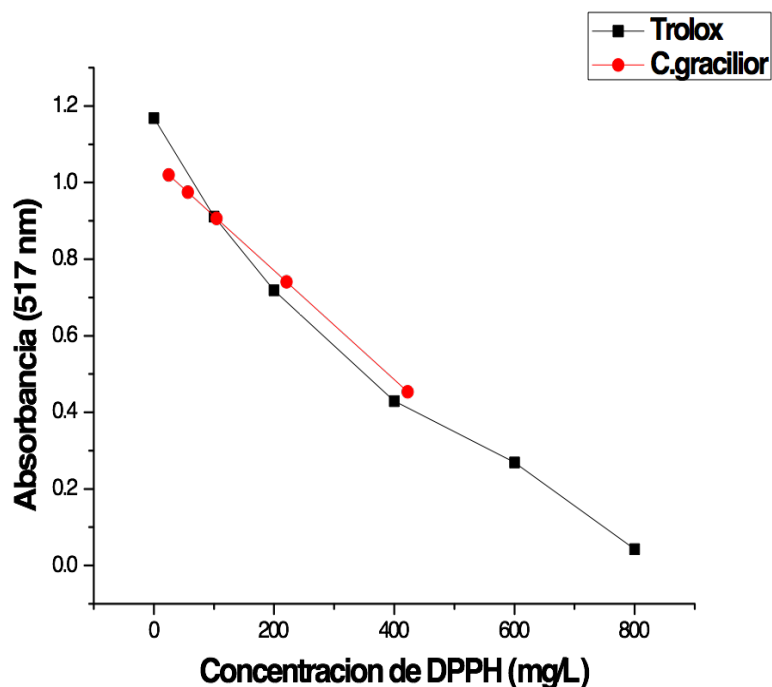


Figura 8. Relación de las regresiones lineales de los resultados de la capacidad antioxidante del Trolox y del extracto metanólico de las flores de *C. gracilior* obtenidos por el método de DPPH.

6.2.2. Análisis por cromatografía en capa fina

Una vez obtenidas las 237 fracciones, se realizaron los perfiles cromatográficos empleando la técnica de cromatografía en capa fina. Como resultado del monitoreo de las fracciones con CCF, se agruparon las fracciones con perfiles cromatográficos parecidos. En la Tabla 3 se presentan las agrupaciones de las fracciones obtenidas, así como sus rendimientos. El aspecto físico y los perfiles cromatográficos permitieron reunir

las fracciones 83 a la 90 en una nueva fracción “F90”. En el caso de “F90”, se mostró como un polvo blanco uniforme. Su rendimiento fue mayor el de los demás grupos. Aunado a esto, como se muestra en la Figura 10, su perfil cromatográfico era parcialmente sencillo.

Tabla 2. Resumen de las condiciones experimentales del fraccionamiento a gran escala del extracto metanólico.

Fracciones colectadas	Fase móvil	Fracciones agrupadas	Clave SC (sin clave)	Peso (mg) ND (no determinado)
1-5	Hexano 100%	1-40	SC	ND
6-10	Hexano-CH ₂ Cl ₂ (90:10)	41-82	SC	ND
11-15	Hexano-CH ₂ Cl ₂ (80:20)	83,84,87-90	F90	252.3
16-55	Hexano-CH ₂ Cl ₂ (70:30)	85	F85	47.5
56-61	Hexano-CH ₂ Cl ₂ (60:40)	86	F86	63.4
62-71	CH ₂ Cl ₂ (100%)	91	F91	17.0
72-97	CH ₂ Cl ₂ :Acetona (90:10)	92-107	SC	ND
98-115	CH ₂ Cl ₂ :Acetona (80:20)	108-109	F109	12.0
116-149	CH ₂ Cl ₂ :Acetona (70:30)	108-154	SC	ND
150-206	CH ₂ Cl ₂ :Acetona (50:50)	155-196	SC	ND
207-224	Acetona (100%)	200-207	SC	ND
225-228	Acetona: MeOH (70:30)	208-237	SC	ND
229-231	Acetona:MeOH (50:50)			
232-237	MeOH (100%)			

6.2.3. Fraccionamiento secundario de la fracción “F90”

Con el propósito de obtener una muestra que presentara características químicas homogéneas, así como un perfil cromatográfico mejor resuelto, se realizó un segundo fraccionamiento. Como resultado, se obtuvieron 7 nuevas fracciones que se registran en la Tabla 4, donde también se exhiben sus rendimientos.

Tabla 3. Grupos de fracciones reunidas y sus rendimientos.

Fracciones reunidas	Peso (mg)
1-40	297.8
41-71	80.4
72-81	17.2
82-90	361.4
91-107	141.8
108 (Clave: CGF-108)	12.2
109-140	ND
141-200	ND
201-237	ND



Figura 9. Perfil cromatográfico en capa fina de la fracción “F90”. Fase estacionaria: gel de Sílice, MeOH:CH₃CN (50:50).

Con base en los rendimientos, así como en el perfil cromatográfico que se presentara mejor resuelto como se muestra en la Figura 11, se trabajó con la muestra “F90A”.

6.2.4. Purificación de compuestos por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución

Con el fin de obtener compuestos puros de la fracción “F90A”, la muestra se analizó mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución. En dicho análisis, se empleó un módulo de separación Waters 2695 con un detector de arreglo de fotodiodos Waters 2998. Para determinar las condiciones de resolución de los componentes de la fracción “F90A”, inicialmente se empleó una columna analítica Eclipse XBD-C18 (3.5 μ m, 4.6 x 150 mm), para la cual la fase móvil que fue más adecuada para resolver el cromatograma fue de CH₃CN:CH₃OH (95:5) con un flujo isocrático de 0.25 mL/min. Después, el fraccionamiento se llevó a cabo con una columna preparativa PrepHT XBD-C18 (21.2 x 150 mm, 5 μ m).

Tabla 4. Resumen de las condiciones experimentales del fraccionamiento secundario por solubilidad.

Solvente	Fracción	Peso (mg)
Metanol	F90A	123.7
Metanol:Acetona (1:1)	F90B	32.6
Acetona	F90C	15.2
CH ₂ Cl ₂	F90D	36.8
Acetonitrilo	F90Ac	16.4
H ₂ O	F90 H ₂ O	3.2
Etanol	F90 etanol	16.5



Figura 10. Perfil cromatográfico en capa fina de la fracción “F90A”. Fase estacionaria: Silica gel 60, C-18 F₂₅₄, Fase móvil: MeOH:CH₃CN 95:5.

En este caso, el flujo fue isocrático a 1.0 mL/min. Como resultado, se obtuvo el cromatograma a nivel analítico que se presenta en la Figura 12, donde se puntualizan los picos que se colectaron de manera individual para su posterior análisis en RMN.

Por otro lado, en la Tabla 5, se registra el rendimiento de cada pico. Claramente, se puede apreciar que el pico 5 fue el que presentó un mejor rendimiento, el cual, en concordancia con la Figura 12, es el que muestra un pico más abundante que los demás, lo cual sugiere que este pudiera ser el mayoritario.

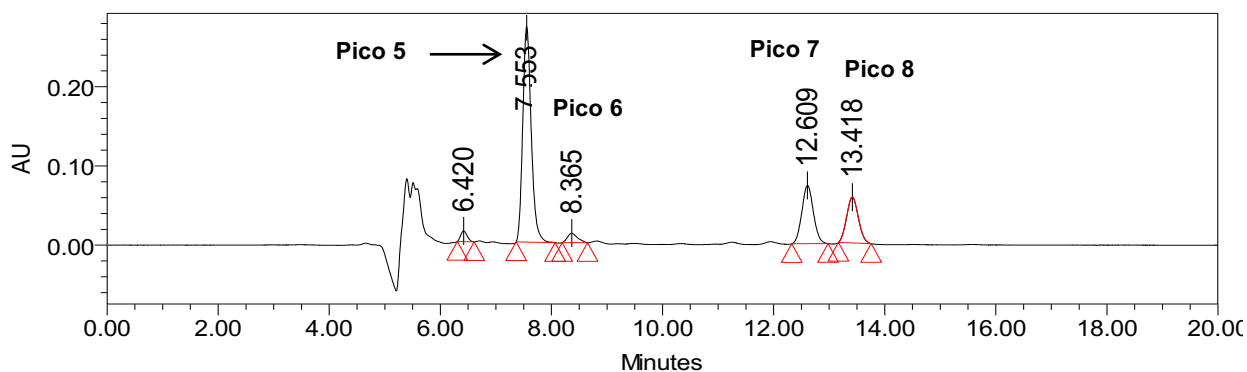


Figura 11. Cromatograma de la fracción “F90A”. Fase estacionaria: Eclipse XBD-C18 (3.5 μ m, 4.6 x 150 mm), fase móvil: 95:5 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ isocrático, flujo: 0.25 mL/min.

Tabla 5. Rendimientos de los picos aislados del cromatograma de la muestra “F90A”.

Pico	Rendimiento (mg)
5 (Clave: CGF5)	30
6	5
7	4.8
8 (Clave: CGF8)	4.6

6.2.5. Determinación de las estructuras de los compuestos mediante RMN

6.2.5.1. Características estructurales comunes de los compuestos aislados

Los estudios químicos realizados sobre el extracto metanólico de las flores de *C. gracilior* permitieron aislar 3 compuestos, a los cuales se asignaron las claves CGF-5, CGF-8 y CGF-108. Dos de ellos alcanzaron una pureza adecuada para avanzar con su elucidación estructural. Sin embargo, los tres comparten características espectrales que los identifican claramente como triterpenos. En los espectros de todos, se identificó un grupo olefínico del tipo $R_1R_2C=CHR$, donde los R representan cadenas carbonadas, lo cual fue determinado a través de la señal del protón vinílico alrededor de $\delta_H = 5.12$ y confirmado en los espectros de RMN de ^{13}C alrededor de $\delta = 127$ ($=\underline{C}HR$) y $\delta = 140$ ($R_1R_2\underline{C}=CHR_3$). Asimismo, los 3 compuestos muestran en sus espectros de RMN de 1H , un metilo doblete a campo alto y seis señales adicionales para igual número de metilos, para un total de 7 metilos en cada compuesto. Otras características estructurales que soportan la naturaleza triterpénica común fueron los 8 metilenos y los 9 metinos presentes en cada uno de los compuestos. A parte de la presencia de esos grupos comunes, cada compuesto mostró algunos que le son propios. Por ejemplo, de los 3 compuestos, únicamente CGF-5 tiene un carbonilo de ácido en $\delta = 179.66$, mientras que por otra parte, sólo en CGF-108, se identificó una glucosa. A continuación, se discuten algunos detalles de las características particulares de los tres compuestos aislados.

6.2.5.2. Características espectrales particulares de los compuestos

Debido a que por lo general un espectro de RMN de ^{13}C muestra un panorama mucho menos complejo que el de los protones, se utilizaron dichos espectros para acercarse a la fórmula molecular de cada uno de los compuestos, contabilizando el número total de señales en el espectro completo y determinando el grado de sustitución de cada carbono, o sea su naturaleza, a través del experimento DEPT. Los resultados de esos análisis se detallan a continuación.

6.2.5.2.1. Compuesto CGF-5:

El compuesto tuvo impurezas de consideración que interfirieron en la determinación exacta del número de carbonos, debido a la dificultad para discriminar las señales de las impurezas. Esas impurezas se pueden apreciar en el espectro de RMN de ^1H completo. Por ejemplo, el doblete en $\delta = 2.73$ no tiene acoplamiento con las señales del constituyente mayoritario de la mezcla (Figura 12). Además del grupo $\text{C}=\text{C}$ y del carbonilo de ácido, sólo se pudieron determinar con certeza la presencia de 7 CH_3 (Figura 13) y 8 CH_2 (Figuras 14 y 15).

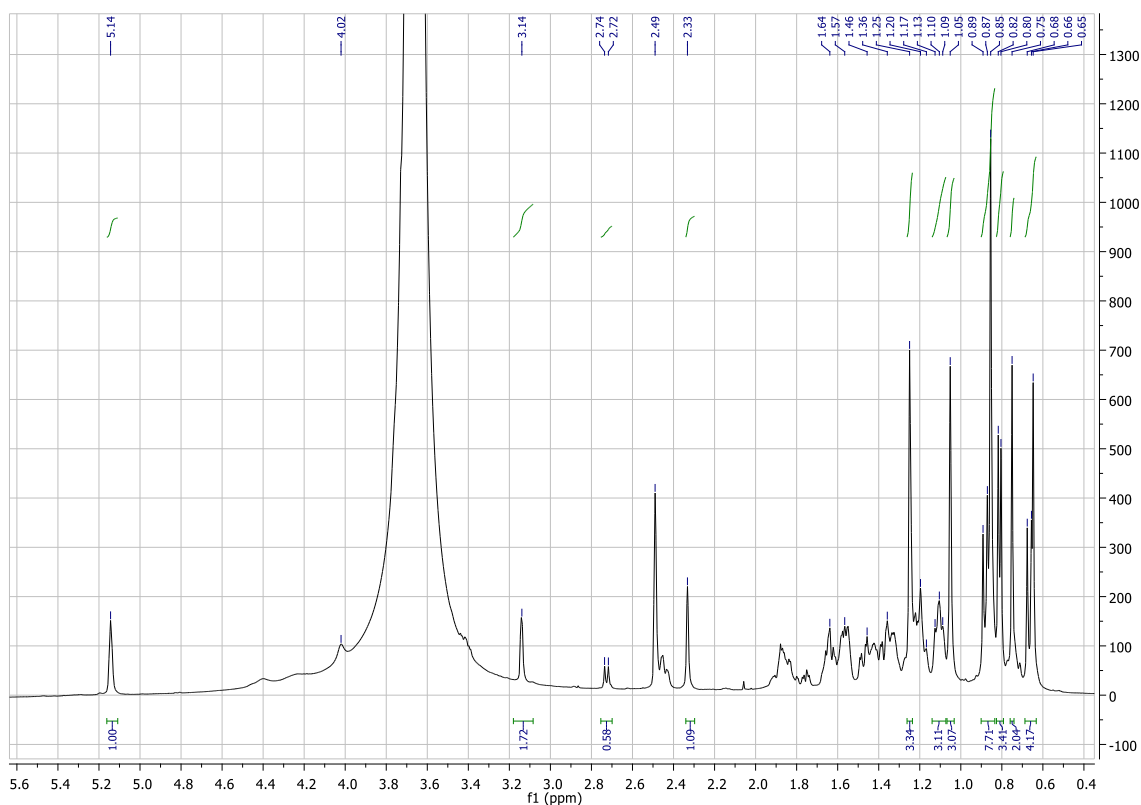


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H de la muestra CGF-5 (^1H vinílico en 5.14 ppm) (DMSO-D_6).

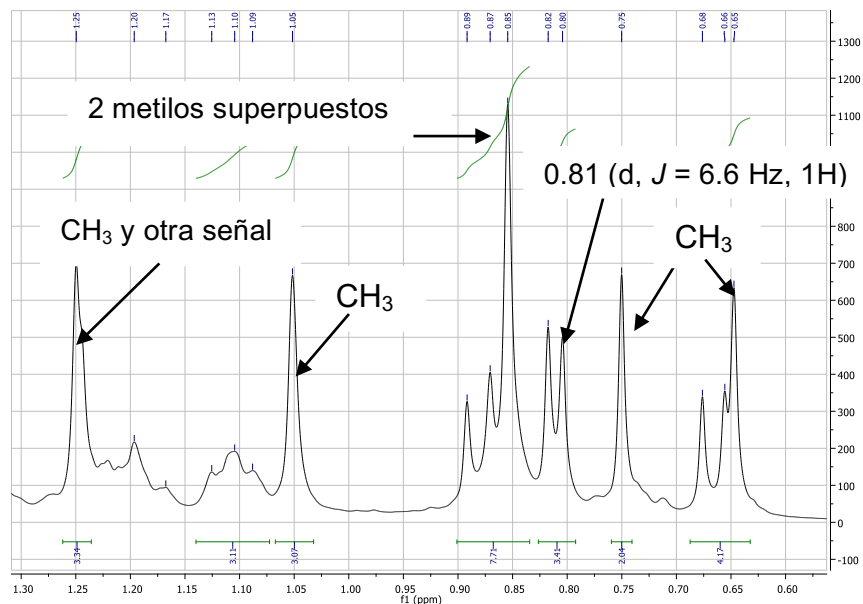


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H de la muestra CGF-5 (región de los 7 CH_3) (DMSO-D_6).

Por lo tanto, con esta información, no se logró establecer una fórmula molecular para este compuesto. Se hará un análisis más detallado de las correlaciones en los diferentes espectros bidimensionales para intentar establecer al menos una fórmula molecular la cual sirve de base para la búsqueda bibliográfica de opciones de estructura.

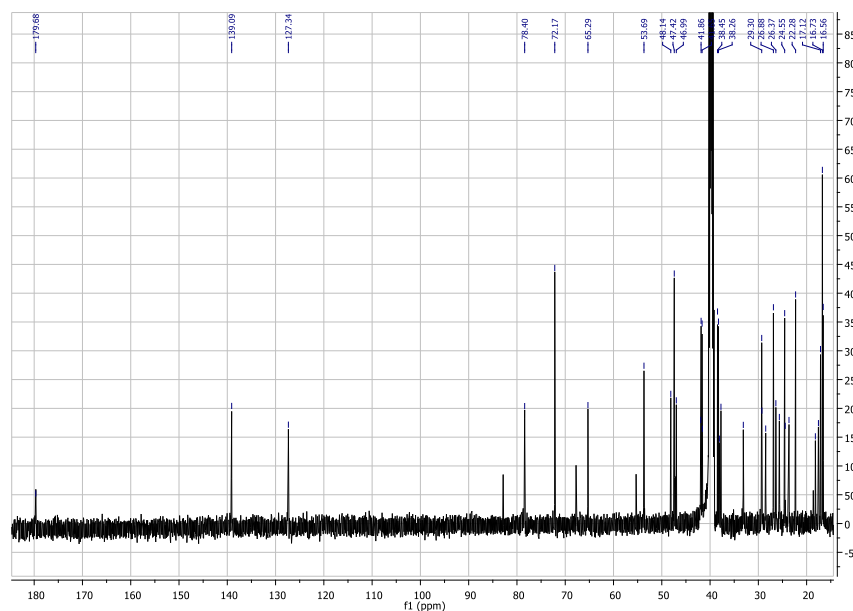


Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C de la muestra CGF-5 (el carbonilo en $\delta = 179.7$ y el grupo $\text{C}=\text{CH}$ en $\delta = 139.1$ y 127.3) (DMSO-D_6).

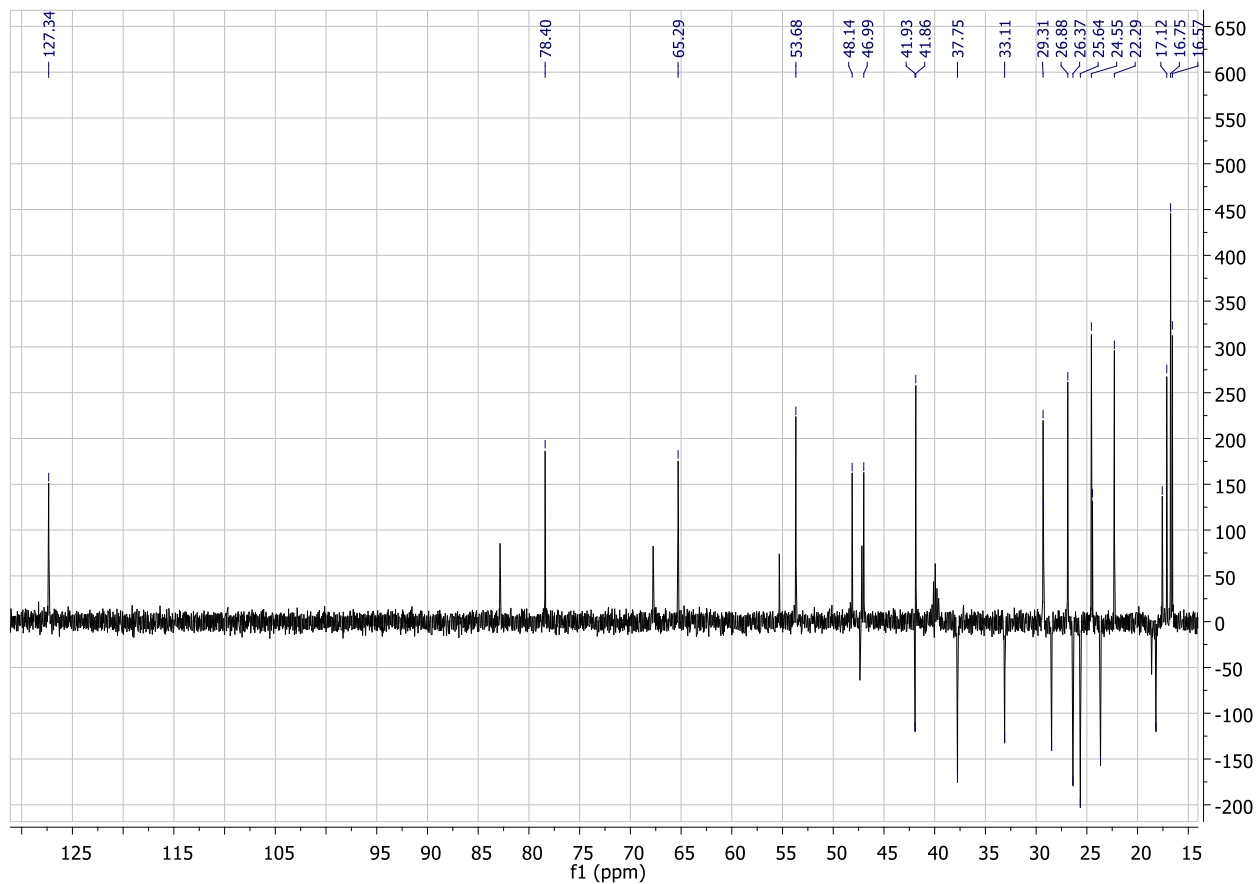


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C modalidad DEPT de la muestra CGF-5 (DMSO-D_6).

6.2.5.2.2. Compuesto CGF-8:

Este compuesto fue aislado como un polvo con un grado de pureza muy satisfactorio. Mediante una comparación de sus espectros de RMN de ^{13}C completo (Figura 16) y el DEPT (Figura 17), se contabilizaron 7 CH_3 , 8 CH_2 , 9 CH y 4 C cuaternarios.

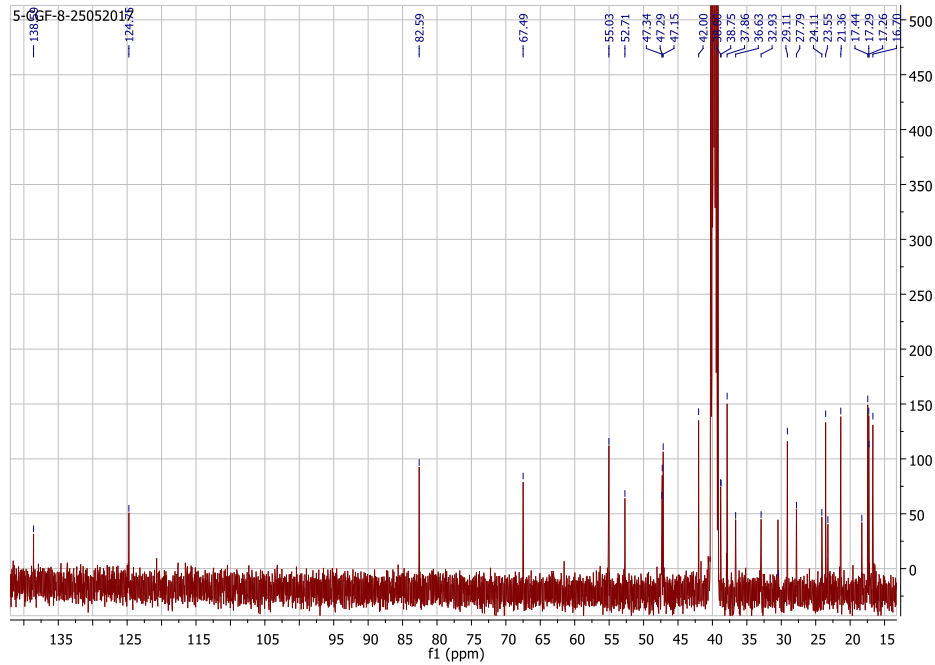


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C completo de la muestra CGF-8 (DMSO-d_6).

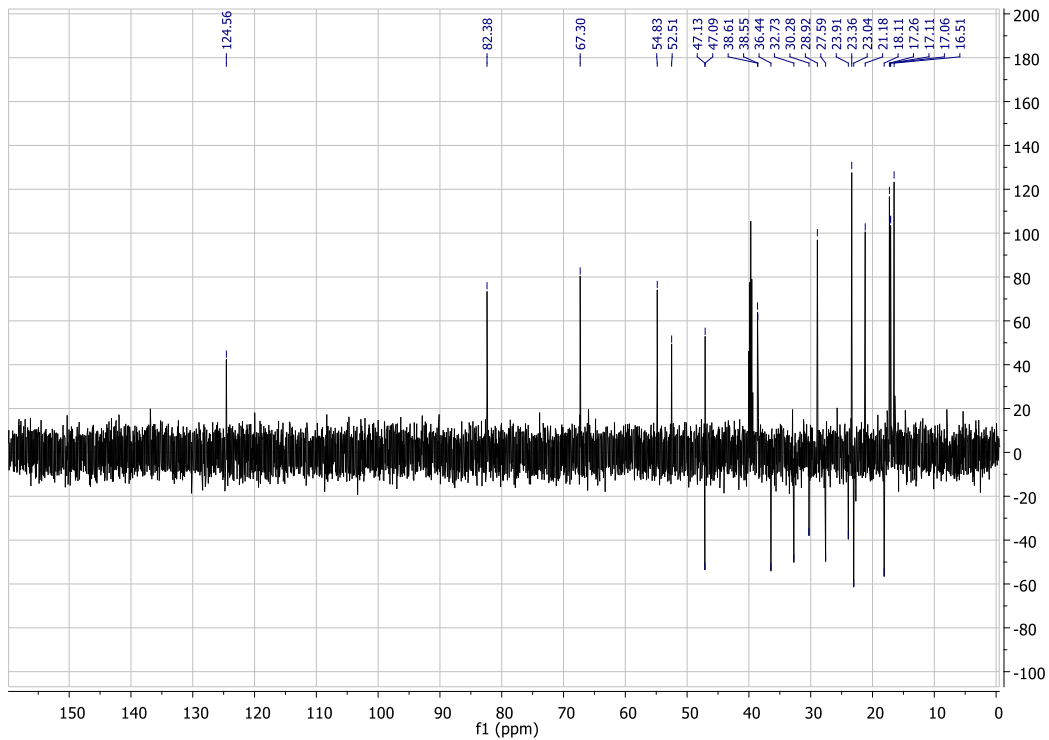


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C modalidad DEPT de la muestra CGF-8 (DMSO-d_6).

Se aprecian los 8 CH_2 en fase negativa en este espectro.

A continuación, se indican las posiciones registradas de las señales de ^{13}C del compuesto CGF-8.

- a) 7 CH_3 : $\delta = 16.70, 17.26, 17.29, 17.44, 21.36, 23.36, 29.11$
- b) 8 CH_2 : $\delta = 18.11, 23.04, 23.91, 27.59, 30.28, 32.73, 36.44, 47.13$.
- c) 9 CH : $\delta = 38.55, 38.61, 47.09, 52.51, 54.83, 67.30$ (CH-O), 82.38 (CH-O), 124.56 ($=\text{CHR}$) y 1 CH solapado, cuya posición aún no se ha determinado.
- d) 4 Carbonos cuaternarios (C): $\delta = 37.86, 42.00, 47.15, 138.59$ ($\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{CHR}$).

Haciendo un balance de los grupos identificados, se pudo proponer la fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_2$ (PM = 416). Con esta fórmula $\text{C}_n\text{H}_m\text{O}_x$, se determinó que la molécula tiene un grado de insaturación $I = n - m/2 + 1 = 28 - 48/2 + 1 = 5$ (5 moléculas de H). Dada la presencia del grupo vinilo en la molécula que es de un grado de insaturación, el compuesto debe ser de 4 anillos. Sin embargo, en la búsqueda de las opciones descritas para esta fórmula molecular, ninguna de las numerosas estructuras descritas satisfizo las características espectrales experimentales del compuesto. Por esta razón, y en base a los requerimientos de los espectros, se propuso la estructura de la Figura 18 para el compuesto no reportado CGF-5.

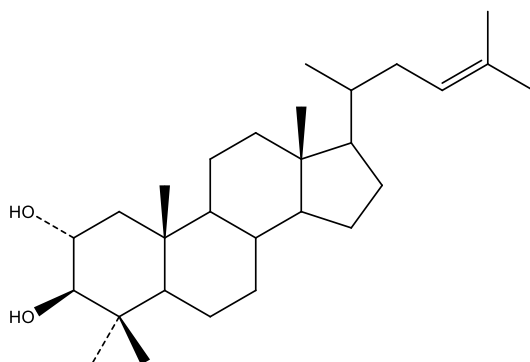


Figura 18. Estructura deducida para el compuesto CGF-8.

Solo resta asignar los hidrógenos y confirmar algunas correlaciones claves en el espectro HMBC.

6.2.5.2.3. Compuesto CGF-108:

Este compuesto se obtuvo igualmente con alta pureza como se puede apreciar en su espectro de RMN ^1H (Figura 19). Un rasgo distintivo de su estructura es la observación de señales de un carbohidrato en la región comprendida entre $\delta = 2.80$ y $\delta = 5.00$ (Figura 20). En dicha región, aparece un doblete en $\delta = 4.20$ ($J = 7.8$ Hz), característico del ^1H anomérico. Dicho protón permitió determinar la posición de los demás hidrógenos del azúcar (ver Tabla 6) a través del COSY (Figura 21). Sin embargo, las multiplicidades de la mayoría de sus protones resultó en un patrón de acoplamiento más complejo que el habitualmente observado para los azúcares (dd, o tripletes); esto sugirió que los H del anillo de la piranosa se acoplaron con los OH. De esta manera, se tuvieron los siguientes valores de δ y (J): H-2: 2.88 (td, 8.5, 4.5 Hz), H-3: 3.11 (td, 8.8, 4.2 Hz), H-4: 3.01 (m), H-5: 3.06 (m); H-6: 3.39 (m) y H-6': 3.63 dd (11.1, 4.6 Hz). También se identificaron las señales características de un triterpeno con grupo vinilo en 5.31 que se ve como un doblete deforme ($J = 4.8$ Hz, 1 H). En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 22), se observaron 35 carbonos, seis de los cuales se encuentran en la región de los azúcares.

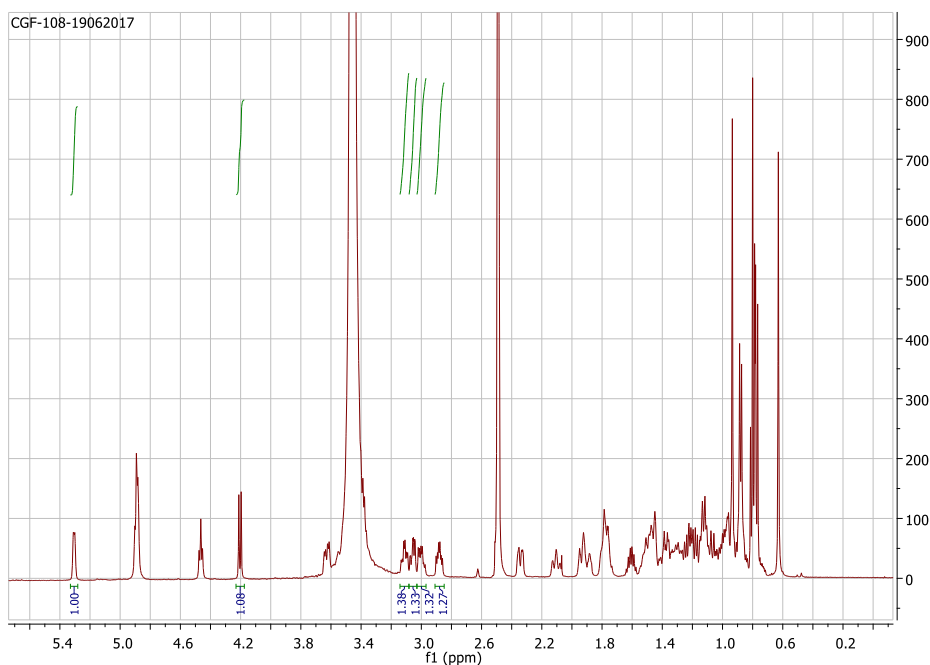


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H completo del compuesto CGF-108.

El estudio completo de los espectros de este compuesto permitió deducir la estructura de un glicósido del nortriterpeno indicado en la Figura 23, cuyas constantes espectroscópicas aparecen en la Tabla 6.

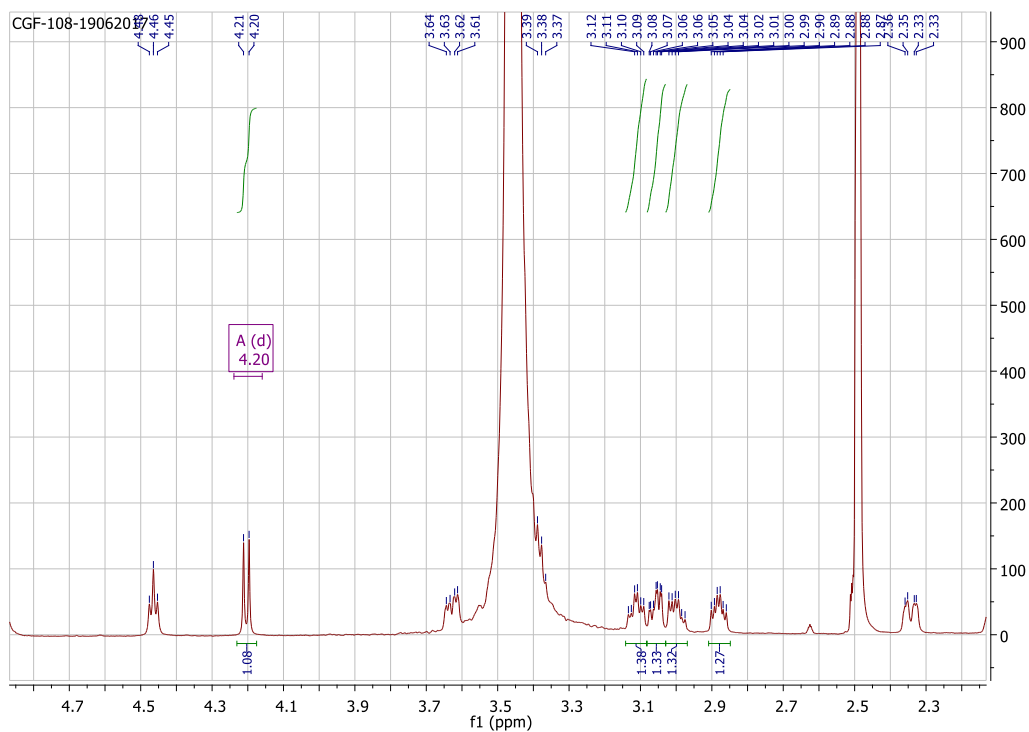


Figura 20. Región de campo bajo del azúcar del compuesto CGF-108 (δ de 2.70 a 4.7).

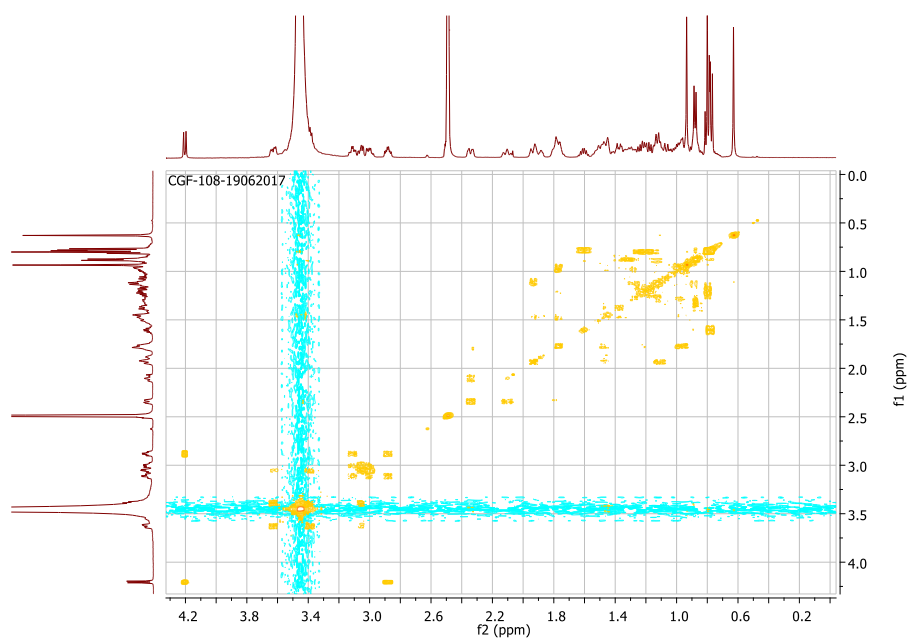


Figura 21. Espectro de RMN bidimensional ^1H - ^1H COSY del compuesto CGF-108.

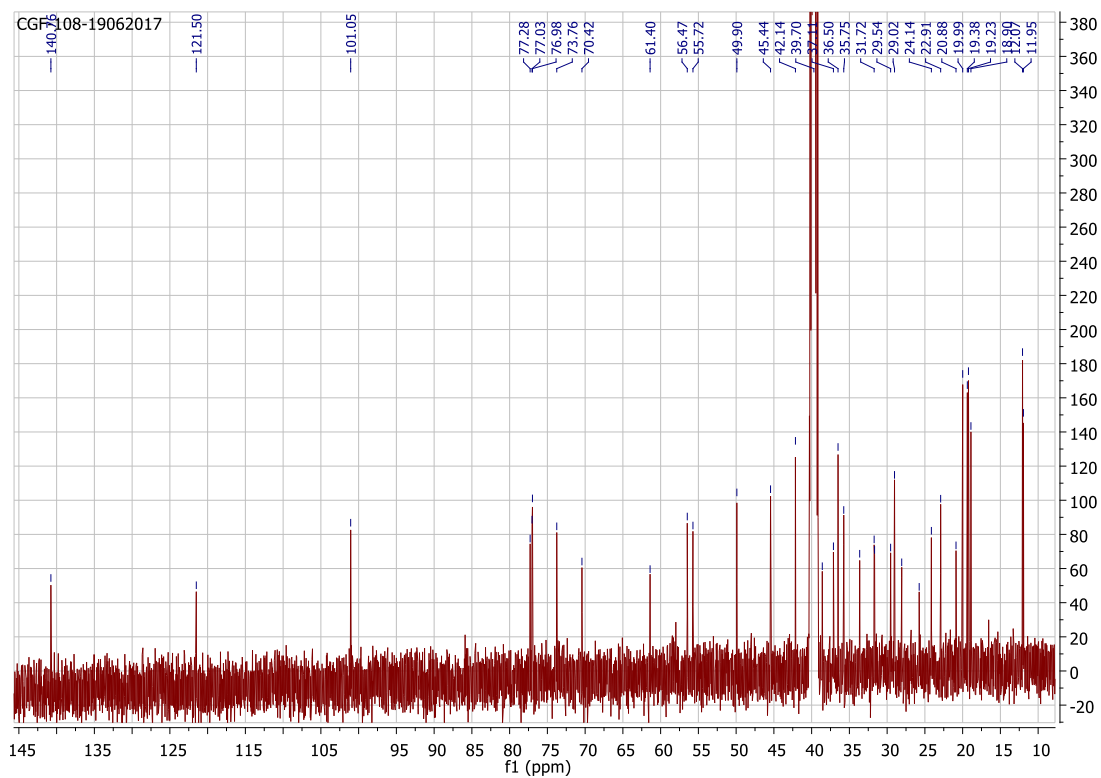


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C completo del compuesto CGF-108.

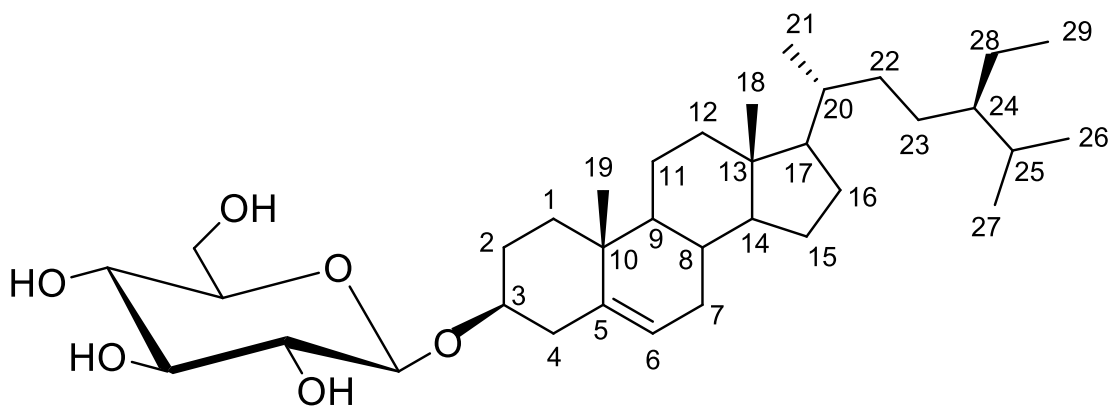


Figura 23. Estructura del triterpeno CGF-108, identificado como el daucosterol.

Tabla 6. Resumen de las constantes espectroscópicas del compuesto CGF-108.

Posición	δ_C	δ_H	Multiplicidad	J (Hz)	Número de H
1	37.1	1.77 0.98	m m		2
2	29.5	1.79 1.46	m m		2
3	77.3	3.43	*		1
4	38.6	2.35 2.1	m t	11.4	2
5	140.8	-			-
6	121.5	5.31	d	4.8	1
7	31.6	1.48 1.38	m m		2
8	31.7	1.92	m*		1
9	49.9	0.88	m		1
10	36.5	-			-
11	20.9	1.46 1.38	m m		2
12	39.4	1.94 1.12	m* m*		2
13	42.1	-			-
14	56.5	0.97	m		1
15	24.1	1.53 1.03	m m		2
16	28.0	1.78 1.21	m m		2
17	55.7	1.09	m		1
18	11.9	0.63	s		3
19	19.4	0.94	s		3
20	35.7	1.32	m		1
21	18.9	0.90	d	6.4	3
22	33.6	1.30 0.99	m m		2
23	25.7	1.12	m		2
24	45.4	0.90	m		1
25	29.0	1.62	m		1
26	19.2	0.77	d	6.8	3
27	20.0	0.79	d	6.6	3
28	22.9	1.20	m		2
29	12.0	0.80	t	6.8	3

* Señales superpuestas con otras

Tabla 6. Resumen de las constantes espectroscópicas del compuesto CGF-108 (continuación).

Glu-1	101.0	4.21	d	7.8	1
Glu-2	73.8	2.88	td	8.5 4.5	1
Glu-3	77.03	3.11	td	8.8 4.2	1
Glu-4	70.4	3.01	m		1
Glu-5	76.9	3.06	m		1
Glu-6	61.4	3.39 3.63	m dd	11.1 4.6	1 1

7. Conclusiones

La evaluación de la capacidad antioxidante del extracto metanólico preparado a partir de las flores de *Crataegus gracilior* recolectadas en Pinal de amoles, Querétaro, utilizando un método electroquímico complementado con el ensayo colorimétrico del DPPH reveló una actividad equivalente a la del Trolox. El estudio químico convencional preliminar del extracto condujo a la identificación de tres triterpenos entre los metabolitos secundarios mayoritarios, uno de los cuales, el daucosterol, ya había sido caracterizado por nuestro grupo en las hojas de la misma especie vegetal. Aunque no se ha reportado hasta la fecha una actividad vasorrelajante del daucosterol identificado en este trabajo, éste y los otros podrían tomarse en cuenta como posibles marcadores químicos de las flores de esta especie. Estos datos, todavía incompletos, cubren uno de los requisitos previos indispensables para la elaboración de un extracto estandarizado a partir de una de las especies de tejocote mexicanas. La siguiente etapa, ya en ejecución, se encuentra enfocada a la identificación de los principales compuestos fenólicos característicos del género, algunos de los cuales han sido utilizados en la estandarización de extractos de *Crataegus* de otros países.

8. Bibliografía

- Aslam M, Ahmad M, Mamat A. **2015**. Pharmacological potential of vitexin. Indian Journal of Pharmacy and Science 2: 114-122.
- Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana **2009**: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php> (Consultado en Septiembre de 2015).
- Bilia RA, Eterno F, Bergonzi MC, Mazzi G, Vincieri FF. **2007**. Evaluation of the content and stability of the constituents of mother tinctures: The case of *Crataegus oxynata* L. and *Heriacium pilosella* L. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 44: 70-88.
- Caballero-George C, Vanderheyden PM, De Bruyne T, Shahat A, Van Den Heuvel H, Solis P, Gupta M, Claeys M, Pieters L, Vauquelin G, Vlietinck A. **2002**. *In vitro* inhibition of Angiotensin II binding on the human AT receptor by proanthocyanidins from *Guazuma ulmifolia* bark. Planta Medica 68(12):1066-1071.
- Cardenas, A, Gomez M, Frontana C. **2014**. Relationship between the chemical structures of antioxidants and the differences in their Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) by electrochemical methods. Journal of Electroanalytical Chemistry 729: 116-120.
- Chang Q, Zuo Z, Harrison F, Sing Sum M. **2002**. Hawthorn. Journal of Clinical Pharmacology 42: 605-612.
- Chevallier A. **1998**. Enciclopedia de plantas medicinales. Durling Kindersley, Madrid.
- Chevion S, Chevion M, Chock B, Beecher G. **1999**. Antioxidant capacity of edible plants: Extraction protocol and direct evaluation by cyclic voltammetry. Journal of medicinal Food 2: 1.
- Cui-Cui L, Ying-qi X, Ji-Chao W, Peng-Zhou H, Yan W, Cheng W, Jian-wei W, Jian-cui Q, Young Z, Zhi-miin D. **2013**. Vitexin protects against cardiac hypertrophy via inhibiting calcineurin and CaMKII signaling pathways. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology 386: 747-755.
- Eggleston, W. W. **1909**. The Crataegi of Mexico and Central America. Bull. Torr. Botanical Club 36: 501-514.

- Euromonitor. **2016**. <http://www.euromonitor.com/herbal-traditional-products-in-china/report> (Consultado en Septiembre de 2016).
- García-Mateos R, Aguilar-Santelises L, Soto-Hernandez M, Nieto-Ángel R, Kite G. **2012**. Compuestos fenólicos totales, flavonoides y actividad antioxidante en las flores de *Crataegus* spp. de México. *Agrociencia* 46: 651-662.
- Hellenbrand N, Sendker J, Lechtenberg M, Petereit F, Hensel A. **2015**. Isolation and quantification of oligomeric and polymeric proanthocyanidins in leaves and flowers of Hawthorn (*Crataegus* spp). *Fitoterapia* 104: 14-22.
- Jiménez A. **2012**. *Herbolaria Mexicana*. Biblioteca básica de agricultura. Segunda edición 245.
- Kilmartin P, Zou H, Waterhouse L. **2001**. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *Journal Agricultural Food Chemistry* 49: 1957-1965.
- Koch E, Abdul F. **2011**. Standardized extracts from hawthorn leaves and flowers in the treatment of cardiovascular disorders-Preclinical and Clinical studies. *Planta Medica*. 77: 1123-1128.
- Kunle OF, Egharevba HO, Ahmadu PO. **2012**. Review: Standardization of herbal medicines. *International Journal of Biodiversity and Conservation* 43: 101-002.
- Linares N. **2013**. *Plantas medicinales*. UPA Madrid.
- Mateos ML. **2013**. Relación estructura actividad de proantocianidinas procedentes de fuentes naturales de origen vegetal. Universitat de Barcelona, Departamento de Química analítica.
- Mediherb. Hawthorn M1330. <http://www.mediherb.com/> (Consultado en Septiembre de 2016).
- Moon JK, Shibamoto T. **2009**. Antioxidant assays for plants and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1655-1656.
- Morales K. **2012**. Estudio comparativo del colorante natural betalaína estabilizado, obtenido de productos nacionales de la región. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Querétaro.

- Morales MA, Morales JP. **2015**. Plantas medicinales y medicina natural; Plantas medicinales, fitofármacos y fitomedicamentos: Hacia una fitomedicina (Fitoterapia moderna y racional), basada en la evidencia científica. Santiago de Chile.
- Nuñez-Colín CA, Nieto AR, Barriegos-Priego AF, Segura S, Sahagún-Castellanos J, Gonzalez F. **2008**. Distribución y caracterización eco-climática del género *Crataegus* L. (Rosaceae, SUBFAM. *Maloidaeae*) en México. Revista Chapingo Serie Horticultura 14: 177-184.
- Nuñez-Colín CA, Hernández-Martínez MA. **2011**. La problemática en la taxonomía de los recursos genéticos de Tejocote. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 2: 141-153.
- Newman DJ, Cragg GM. **2016**. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. Journal of Natural Products 79: 629–661.
- Patwardhan B, Vaudya AD, Choghade M. **2004**. Ayurveda and natural products Drug Discovery. Current science 86: 789-799.
- Pérez JA, Vanaclocha B, Foster S, Cruz JS. **2007**. Más de 100 plantas medicinales. La obra social de la caja de Canarias, Islas Canarias.
- Pérez MD. **2014**. Perfil fitoquímico del aceite esencial del futo de Tejocote mexicano (*Crataegus* spp.). Universidad Autónoma de Chapingo.
- Phipps JB. **1997**. Monograph of northern Mexican *Crataegus* (Rosaceae). Botanical Miscellany. 15:1-94.
- Phipps JB, **2007**. Miscellaneous typifications, new combinations and one new variety in North American *Crataegus* (Rosaceae). Journal of the Botanical Research Institute of Texas. 1:1005-1010.
- Popovic-Milenkovic MT, Tomovic MT, Brankovic SR, Ljubic BT, Jancovic SM. **2014**. Antioxidant and anxiolytic activities of *Crataegus niga* Wald. Et kit.Berries. Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug research 71: 279-285.
- Ratcliffe RG, Roscher A, Shachar-Hill Y. **2001**. Plant NMR spectroscopy. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.
- Read, B. **1936**. Chinese medicinal plants from the Pen Ts'ao Kang Mu. Peking Natual History Bulletin.

- Rice-Evans CA, Miller JN, Paganga G. **1995**. Review: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical & Biology Medicine* 7: 933-956.
- Rigelsky JM, Sweet BV. **2002**. Hawthorn: Pharmacology and therapeutic uses. *American Journal of Health-System Pharmacognosist*. 59: 417-422.
- Sarker S, Latif Z, Gray A. **2006**. *Natural Products Isolation*. Second edition. Humana Press. pp: 213-220.
- Sarker S, Nahar L. **2012**. *Natural Products Isolation*. Third edition. Humana Press. pp: 9-10.
- Shalaby E, Shanab M. **2013**. Comparison of DPPH and ABTS assay for determining antioxidant potencial of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 42(5): 556-564.
- Silverstein R, Webster F, Kiemle D. **2005**. *Spectrometric identification of organic compounds*. Seventh edition. John Wiley & Sons, Inc. pp: 1-11.
- Song SJ, Li LZ, Gao PY, Peng Y, Yang JY, Wu CF. **2011**. Terpenoids and hexenes from the leaves of *Crataegus pinnatifida*. *Food Chemistry* 129: 933-939.
- Turdean G, Casoni D, Sarbu C. **2016**. Structure-electrochemical properties correlations of some phenol derivatives investigated by electrochemical techniques. *Journal of the Iranian Chemical Society*. *Journal of Iranian Chemical Society* 16(5): 945-956.
- Wu J, Peng W, Qin R, Zhou H. **2014**. *Crataegus pinnatifida*: Chemical constituents, pharmacology and potential applications. *Molecules* 19: 1685-1712.
- Wu L, Hsu H, Chen Y, Chiu C, Lin Y, Ho J. **2006**. Actividades antioxidantes y anti proliferativas de Pitaya roja. *Química en alimentos* 2: 319-327.