



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Centro de Investigaciones Químicas
Área Académica de Química

**Estudio químico de *Geranium bellum*, *G. potentillaefolium*
y *G. seemanii*. Búsqueda de principios activos para el
tratamiento de la enfermedad de Chagas.**

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Química

Presenta:

M. C. Juan Antonio Gayosso De Lucio



Director de Tesis

Dr. J. Martin Torres Valencia

Agradecimientos

A mis HIJOS

ANTONIO Y RAQUEL

Me dan el mejor aliento de mi vida, la razón más exquisita para esforzarme, la vida es más fácil con su cariño en verdad son mi fortuna.

A MIS PADRES

Gayosso; De Lucio

No ha sido fácil para mí ser padre, pero si les puedo decir a ustedes, que **hicieron un gran trabajo**, recibí la mejor educación sin siquiera imaginarlo, la vida es genial gracias por dármelela.

A MIS HERMANOS

Luis Fernando y Luis Alfredo

Sé que cuento con ustedes y cuentan conmigo, la tranquilidad que siento al verlos y la gran confianza entre nosotros nunca se terminara, les agradezco tanto el que estén conmigo.

A mi esposa

Tere

Parece “condena”, quien sabe, el hecho es que estas a mi lado y seguimos compartiendo la vida ojalá y nada cambie.

A los compañeros de laboratorio

Jonathan (Jhon), Yanet, Jesús (Chuche), Rosa María, Mario, René, Arian, Alejandro (tigre), Martín, un grupo de trabajo surgió, espontáneamente, la estancia laboral fue un gusto en vez de trabajo, gracias por esos momentos tan divertidos.

Profesores del CIQ

Dr. Alejandro, Dr. Villagomez, Dra. Miriam, Dr. Oscar, Dra. Maricruz, Dra. Vero y Dra. Susana, es cierto que el CIQ es la bandera de investigación de la Universidad, hay un gran conocimiento que se aprende y no es en el salón, es en el laboratorio. Para mí fue una gran experiencia vivir 5 años en el centro y siento que aprendí de cada uno de ustedes.

Compañeros de ICSa

Silvia y Carmen, cuando los tramites aquejan nadie mejor que ustedes para extender una solución, gracias por su paciencia y apoyo.

José (theacherito): de los que llegamos temprano y solucionamos lo que podemos ahí estas, gracias amigo.

Ramón: el bonachón de Farmacia que carácter tan ideal tienes, eres un personaje del área gracias por tu apoyo.

Georgina: de las personas que trabajan y no se cansan te agradezco mucho tu apoyo.

Alejandro: de los mejores "tips" de supervivencia laboral sin duda me los has extendido tú, estaría hundido en adeudos administrativos de no habérmelos dado, gracias.

Mini de la O: siempre una sonrisa, siempre de buenas, que agradable es trabajar contigo gracias por tus consejos.

Mirandeli: contar con tu apoyo y amistad es genial, te extiendo mi más grande aprecio, gracias.

Claudia: poco tiempo de conocerte y siento estimarte mucho, es tan sencillo trabajar contigo, me has dado muy buenas lecciones de todo tipo, gracias. Sobre todo por soportarme en la oficina.

M S P Josefina Reynoso Vázquez

Trabajar en Farmacia bajo tu dirección es muy agradable, gracias por todo tu apoyo.

Amigos

Norberto, Erasmo y Silverio (Jarocho), simplemente doy por hecho que cuento con ustedes, gracias por su amistad y apoyo, parece que siempre estamos ahí.

En especial
Dr. J. Martin Torres Valencia

A mi punto de vista asesor, debo agradecerle en tres aspectos: Académico, Laboral y Personal.

Académico: sin duda el incremento en conocimiento es un reflejo de la enorme pasión y dominio que demuestra cuando se discutía un resultado de la investigación, obliga a informarse. Gracias por transmitírmelo.

Laboral: predicar con el ejemplo es una frase que lo describe, siempre cumplido con sus clases, con el llenado de formatos, actividades extracurriculares, etc. siempre de buenas para atender alumnos y tesistas. “No hay de otra Juan” lo mínimo que puedo hacer es comportarme igual.

Personal: gracias por sus consejos evidentemente cambio mi forma de pensar y mi manera de actuar.

Mi más sincero aprecio y amistad.

Me siento muy orgulloso de haber aprendido a su lado.

Parte del presente trabajo se presento en los siguientes congresos.

- **“Compuestos Antioxidantes del extracto de MeOH de *Geranium bellum*”**, 3ª Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica del 15 al 16 de Marzo de 2007, Pachuca Hidalgo Mexico.
- **“Evaluación del Efecto Diurético, Anticoagulante y toxicidad de *Greanium semannii* en rata Winstar Macho”**, XL congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas, 4 al 8 de Noviembre de 2007, Yucatán México.
- **“Evaluación del Efecto Diurético, Anticoagulante y toxicidad de *Greanium semannii* en rata Winstar Macho”**, 3er congreso internacional de Farmacología y Terapéutica, 11 al 14 de diciembre de 2007, Habana Cuba.
- **“Evaluacion del Efecto Diuretico y Toxicidad del Extracto auoso de *Geranium bellum* parte Aérea en ratas Winstar”**, 3er congreso internacional de Farmacología y Terapéutica, 11 al 14 de diciembre de 2007, Habana Cuba.
- **“Cafeoil triterpenos de las raíces de *Geranium Bellum Rose*”**, 3ª Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica. Llevada a. cabo del 7 al 14 de abril de 2008. Pátzcauro Michoacán México.
- **“Evaluación de la protección contra el efecto fotodinámico producido por UV-A, de plantas con actividad antioxidante”**, V Congreso Internacional, XVI Congreso Nacional, VI jornadas científicas de biotecnología molecular y biomedicina. Del 10 al 14 de marzo de 2008, Tuxtla Gutiérrez Chiapas México.
- **“Taninos Y Flavonoides de *Geranium potetillefolium*”** V Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica, los días 28 y 29 de Mayo 2009.

El presente trabajo genero los siguientes artículos científicos.

Juan A. Gayosso-De-Lucio, J. Martín Torres-Valencia, Carlos M. Cerda-García-Rojas and Pedro Joseph-Nathan, “Ellagitannins from *Geranium potentillaefolium* and *G. bellum*”. *Natural Product Communications*, **2010**, 5(4), 531-534.

Juan Gayosso-De-Lucio, Martin Torres-Valencia, Arturo Rojo-Domínguez, Hugo Nájera-Peña, Beatriz Aguirre-López, José Salas-Pacheco, Claudia Avitia-Domínguez, Alfredo Téllez-Valencia “Selective inactivation of triose fosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by brevifolin carboxilate derivatives from *Geranium bellum*”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 5936–5939.

Lista de Abreviaturas.

| | |
|-------------------|---|
| % | Porcentaje |
| $[\alpha]_D^{20}$ | Rotación óptica medida a 20°C |
| ® | Marca registrada |
| µg | Microgramos |
| 1D | Una dimensión |
| 2D | Dos dimensiones |
| 3D | Tres dimensiones |
| A. C. | Antes de Cristo |
| Acetil-CoA | Acetil Coenzima A |
| Acetona- d_6 | Acetona deuterada |
| AcOEt | Acetato de etilo |
| ADP | Adenosin difosfato |
| ATP | Adenosin trifosfato |
| <i>br</i> | Ancha |
| CAN | Canadá |
| CC | Columna cromatográfica |
| CCF | Cromatografía en capa fina |
| cm | Centímetros |
| CYP51 | Citocromo P enzima C14αdemetilasa |
| <i>d</i> | Doble |
| D. C. | Después de Cristo |
| <i>dd</i> | Doble de dobles |
| <i>ddd</i> | Doble de doble de dobles |
| DHF | Dihidrofolato |
| DHFR | Enzima dihidrofolato reductasa |
| DL ₅₀ | Dosis Letal del 50% de la población |
| DMSO- d_6 | Dimetil sulfóxido hexadeuterado |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| <i>dt</i> | Doble de triples |
| g | Gramo |
| H | Horas |
| HMC-1 | Células humanas de hematocitos tipo 1 |
| HTS | Estudio de alto rendimiento |
| Hz | Herzt |
| IC ₅₀ | Concentración inhibitoria del cincuenta por ciento de la población o actividad enzimática |
| IND | India |
| IPDT | Antidiabético de la familia de las sulfas. |
| IR | Infrarrojo |
| <i>J</i> | Constante de acoplamiento |
| JAP | Japón |
| KDa | Kilodaltones |

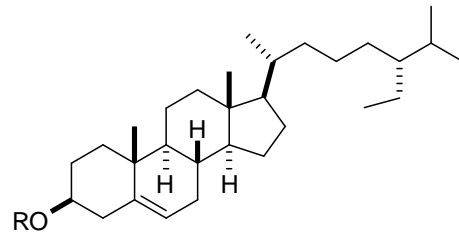
| | |
|--------------|--|
| Kg | Kilogramos |
| L | Litros |
| LDL | Lípido de baja densidad siglas en inglés. |
| MeOH | Metanol |
| mg | Miligramo |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| <i>Mult.</i> | Multiplicidad |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| p. f. | Punto de Fusión |
| PBP1-PBP4 | Transpeptidasas responsables de la formación de la pared celular |
| ppm | Partes por millón |
| QSAR | Cuantificación de la relación estructura actividad |
| RCT | Ensayos clínicos aleatorizados |
| R_f | Factor de retención |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| s | Simple |
| SWI | Suiza |
| <i>t</i> | Triple |
| THF | Terahidrofolato |
| TIM | Triosafosfato isomerasa |
| TIMH | Triosafosfato isomerasa humana |
| TIMTc | Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> |
| UK | Inglaterra |
| USSR | Rusia |
| UV | Luz ultravioleta |
| VIH | Virus de inmunodeficiencia adquirida |
| w/v | Peso/volumen |
| δ | Desplazamiento químico |

RESUMEN

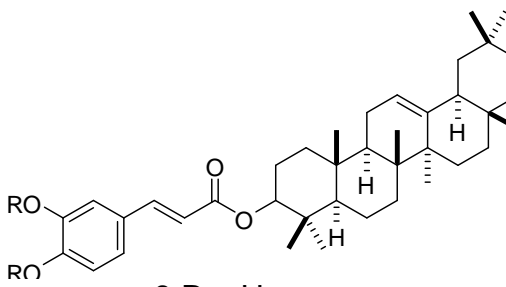
La separación cromatográfica de los extractos de *n*-hexano, AcOEt y MeOH de las raíces de *G. bellum*, *G. potentillaefolium* y *G. seemannii*, condujo a la obtención de β -sitosterol (**1**), glucósido de 3-O- β -sitosterol (**2**), ácido 3-O-cafeoil oleanólico (**3**), ácido 3-O-cafeoil-betulínico (**4**), ácido gálico (**5**), corilagina (**7**) y geraniina (**8**). Por otra parte de los extractos metanólicos de partes aéreas de *G. bellum* se aislaron los compuestos **5**, galato de metilo (**6**), **7–8**, brevifolin carboxilato de metilo (**11**), quercetina (**15**), 3-O- β -D-glucósido de kaempferol (**16**), 3-O- β -D-glucósido de quercetina (**17**) y 3-O- β -D-(6"-O-galoil) glucósido de quercetina (**18**); por su parte del extracto metanólico de *Geranium potentillaefolium* se identificaron los compuestos **5–8**, **11**, kaempferol (**14**) y **15–18**; del extracto acetona:agua de *G. seemannii* se aislaron los compuestos **5**, **7**, **8**, ácido protocatecuico (**9**), ácido brevifolin carboxílico **10**, **14–18** y acetoni geraniina (**19**). Todas las sustancias fueron caracterizadas mediante sus datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C además de sus datos físicos.

La búsqueda de nuevas moléculas líderes para el posible control de la enfermedad de Chagas nos permitió identificar que al compuesto **11** como inhibidor selectivo de la enzima triosa fosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TIMTc), a una concentración de 7 μM inhibió el 50% de la actividad enzimática. La exploración de derivados llevó a la obtención de **10**, **12** y **13** y tri-O-metilbrevifolin carboxilato de metilo (**20**), los cuales presentaron menor actividad que **11**.

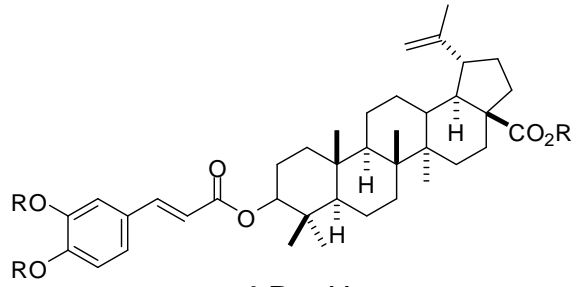
Este es el primer reporte del compuesto **4** en el género y además se obtuvo el nuevo derivado del ácido brevifolin carboxílico **13**.



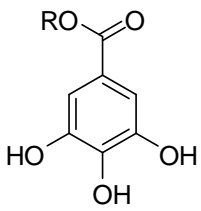
1 R = H
2 R = glucosa



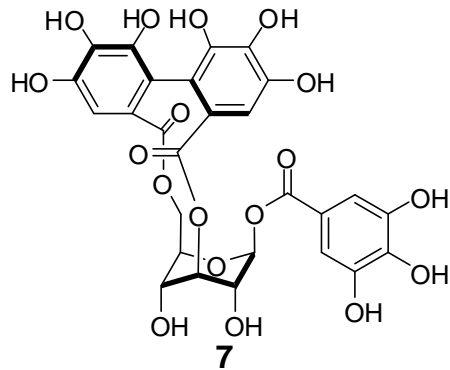
3 R = H
3a R = CH₃



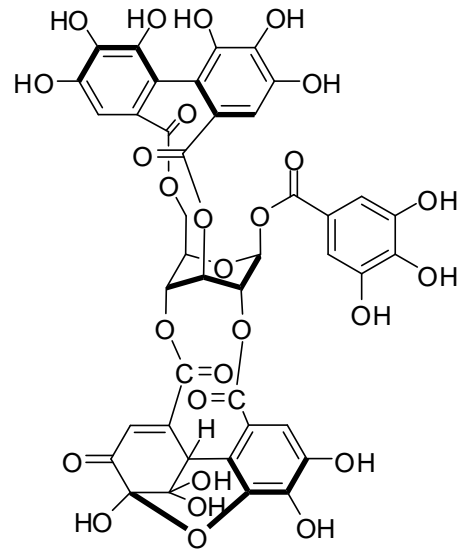
4 R = H
4a R = CH₃



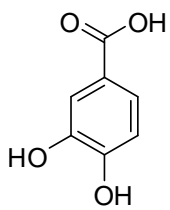
5 R = H
6 R = CH₃



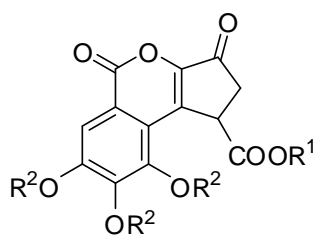
7



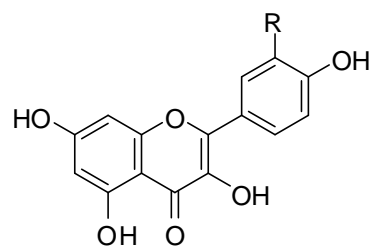
8



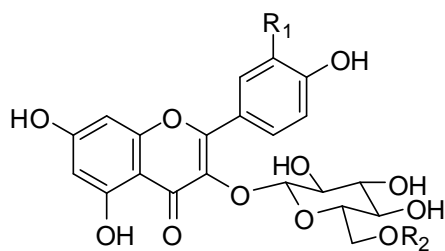
9



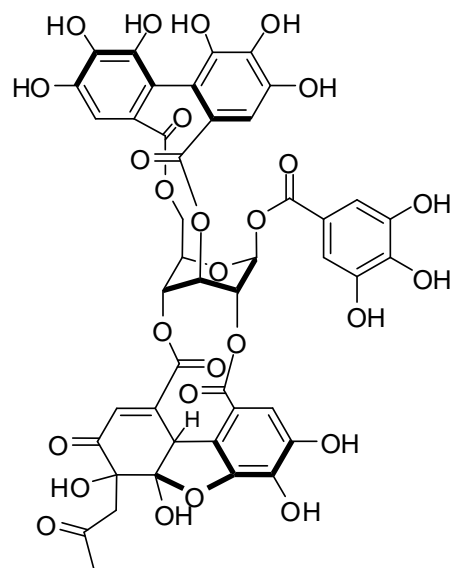
- 10** $R^1 = H, R^2 = H$
11 $R^1 = CH_3, R^2 = H$
12 $R^1 = CH_2-CH_3, R^2 = H$
13 $R^1 = n-Bu, R^2 = H$
20 $R^1 = R^2 = CH_3$.



- 14** $R = H$
15 $R = OH$



- 16** $R^1 = R^2 = H$
17 $R^1 = OH, R^2 = H$
18 $R^1 = OH, R^2 = \text{galoilo}$



19

ABSTRACT

Chromatographic separation of extracts *n*-hexane, AcOEt and MeOH from roots of *G. bellum*, *G. potentillaefolium* and *G. seemannii*, lead to the obtention of β -sitosterol (**1**), 3-O- β -sitosterol glycoside (**2**), 3-O-caffeoil oleanolic acid (**3**), 3-O-caffeoil-betulinic acid (**4**), gallic acid (**5**), corilagin (**7**) and geraniin (**8**). Meanwhile from MeOH extract of aerial parts of *G. bellum* were isolated compound **5**, methyl gallate (**6**), **7-8**, methylbrevifolin carboxylate (**11**), quercetin (**15**), kaempferol 3-O- β -D-glucoside, (**16**) quercetin 3-O- β -D-glucoside (**17**) and quercetin 3-O- β -D-(6"-O-galoi) glycoside (**18**), On the other hand, from MeOH extract of aerial parts of *G. potentillaefolium* identified compounds **5-8**, **11**, kaempferol (**14**) and **15-18**; were identified from acetone-water extract of aerial parts of *G. seemannii* allowed isolation of compounds **5**, **7**, **8**, protocatecuic acid (**9**), brevifolin carboxylic acid **10**, **14-18** and acetonil geraniin (**19**). All substances were characterized by their spectroscopic data ^1H and ^{13}C NMR in comparison with published data.

In search of molecules that can serve as lead in the design of a new drug for treatment of Chagas' disease, we found that methylbrevifolin carboxylate (**11**), inactivate triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) in a species-specific manner at 7 μM concentration. Derivatives exploration led to obtain **10**, **12** and **13** and methyl tri-O-metilbrevifolin carboxylate (**20**), which less activity than **11**.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Historia del uso de plantas medicinales | 1 |
| 1.2 Descubrimiento de fármacos | 2 |
| 1.3 Perspectiva actual de los productos naturales | 11 |
| 2. ANTECEDENTES | 14 |
| 2.1 Productos Naturales | 14 |
| 2.1.2 Ácidos fenólicos | 16 |
| 2.1.2 Flavonoides | 17 |
| 2.2 Actividades biológicas de especies de <i>Geranium</i> | 19 |
| 2.3 Compuestos aislados de especies de <i>Geranium</i> | 20 |
| 2.4 Enfermedad de Chagas | 24 |
| 2.5 Diseño de fármacos y posibles blancos terapéuticos de <i>T. cruzi</i> | 26 |
| 2.5.1 Trypanotona reductasa | 26 |
| 2.5.2 Cisteinas proteinasas | 29 |
| 2.5.3 Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa | 30 |
| 2.5.4 triosafosfato isomerasa | 31 |
| 2.6.5 Dihidrofolato reductasa | 33 |
| 2.7.6 Metabolismo de esteroides | 35 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 38 |
| 4. OBJETIVO GENERAL | 39 |
| 4.1 Objetivos específicos | 39 |
| 5. RESULTADOS | 40 |
| 5.1 Compuestos aislados de raíces extractos AcOEt y MeOH | 40 |

| | |
|---|-----|
| 5.2 Compuestos aislados de partes aéreas, extractos MeOH y acetona:agua | 43 |
| 5.3 Actividad de los compuestos para inhibir la TIMTc | 46 |
| 6. CONCLUSIONES | 53 |
| 7. EVIDENCIAS ESPECTROSCÓPICAS | 54 |
| 7.1 3 β -O-(6',7'-dimetil)- <i>E</i> -Cafeoil oleanolato de metilo (3a) | 54 |
| 7.2 3 β -O-(6',7'-dimetil)- <i>E</i> -Cafeoil betulonato de metilo (4a) | 59 |
| 7.3 Corilagina (7) | 64 |
| 7.4 Geraniina (8) | 68 |
| 7.5 Ácido protocatecuico (9) | 71 |
| 7.6 Ácido brevifolin carboxílico (10) | 73 |
| 7.7 Brevifolin carboxilato de etilo (12) | 76 |
| 7.8 Brevifolin carboxilato de butilo (13) | 78 |
| 7.9 3-O- β -D-Glucósido de kaempferol (16) | 81 |
| 7.10 3-O- β -D-Glucósido de quercetina (17) | 84 |
| 7.11 3-O- β -D-(6''-O-galoil)-Glucósido de quercetina (18) | 87 |
| 7.12 Acetonil geraniina (19) | 91 |
| 7.13 Tri-O-Metil brevifolin carboxilato de metilio (20) | 96 |
| 8. PARTE EXPERIMENTAL | 98 |
| 8.1. Generalidades | 98 |
| 8.2. Separación de los extractos de las raíces de las tres especies | 100 |
| 8.3 Separación de los extractos de las partes aéreas <i>G. bellum</i> y <i>G. potentillaefolium</i> y extracto de acetona agua de <i>G. seemannii</i> . | 103 |
| 8.4 Derivados del ácido brevifolin carboxílico 12 , 13 y 20 | 105 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 107 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1 Productos naturales aislados entre 1970 y 1989 y que llegaron a ser fármacos en 1981–2006. | 6 |
| Tabla 2 Estructuras base de compuestos fenólicos y polifenólicos | 15 |
| Tabla 3 Estructuras de compuestos desarrollados para inhibir la tripanotona reductasa. | 27 |
| Tabla 4 Concentraciones de compuestos para inhibir el 50% de la actividad de la enzima (IC50) del ^{parásito} y la Humana. ⁵¹ | 32 |
| Tabla 5 Comparación de compuestos reportados como inhibidores contra los derivados del ácido brevifolin carboxílico. | 50 |
| Tabla 6 Datos de RMN de 3a y Ref. ⁶⁴ | 57 |
| Tabla 7 Datos de RMN de 4a y Ref. ⁶⁴ | 62 |
| Tabla 8 Datos de RMN de 7 y Ref. ⁶⁵ | 67 |
| Tabla 9 Datos de RMN de 9 y Ref. ⁶⁶ | 71 |
| Tabla 10 Datos de RMN de 10 y Ref. ⁶⁷ | 73 |
| Tabla 11 Datos de RMN de 12 y Ref. ⁷³ | 76 |
| Tabla 12 Datos de RMN de 13 . | 78 |
| Tabla 13 Datos de RMN de 16 y Ref. ⁶⁸ | 81 |
| Tabla 14 Datos de RMN de 17 y Ref. ⁶⁹ | 84 |
| Tabla 15 Datos de RMN de 18 y Ref. ⁶⁹ | 90 |
| Tabla 16 Datos de RMN de 19 y Ref. ⁷⁰ | 94 |
| Tabla 17 Datos de RMN de 3a y Ref. ⁷⁴ | 96 |
| Tabla 18 Polaridades usadas para separar las mezclas de flavonoides 16-18 | 104 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia del uso de plantas medicinales

Varios escritos han destacado la importancia de los compuestos obtenidos de fuentes naturales para el tratamiento de enfermedades humanas, esta tendencia histórica se remonta a los inicios de la medicina.¹⁻⁴

En los primeros registros destacan los de Mesopotamia que datan de 2600 A. C. y en los cuales son descritos remedios hechos con aceites de especies de *Cedrus* (cedro), *Cupressus sempervirens* (ciprés), *Glycyrrhiza glabra* (regaliz), *Commiphora* (mirra) y especies *Papaver somniferum* (amapola), para el tratamiento de dolencias, tos, resfríos, infecciones parasitarias y la inflamación. La medicina egipcia data aproximadamente del año 2900 A. C., pero el registro medicinal más conocido es el “papiro de Ebers” que data de 1500 A. C. y que documenta más de 700 remedios (en su mayoría plantas, aunque se incluyeron órganos de animales junto con algunos minerales) y describe enjuagues de garganta, inhalaciones, cataplasmas, infusiones, pastillas y ungüentos, con cerveza, leche, vino y miel.² En China, el primer registro data de unos 1100 A. C. (WU Shi Er Bing Fang), que contiene 52 prescripciones, seguido por las hierbas Shennong (~ 100 A. C., 365 remedios) y la Tang Herbal (659 A. C., 850 drogas) entre otros. En la India (medicina ayurveda) los registros datan de alrededor de 1000 A. C. (Charaka; Sushruta y Samhitas con 341 y 516 remedios, respectivamente) y este sistema sirvió de base para el texto principal de la medicina tibetana, Gyu-zhi, traducido durante el siglo VIII D. C.²

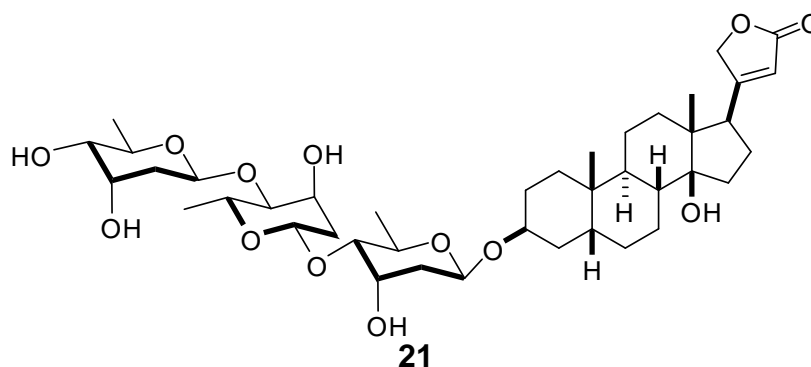
Los griegos contribuyeron sustancialmente al uso racional de remedios herbales. El filósofo y científico natural Theophrastus (~ 300 A. C.) en su “Historia de las plantas”, aborda las cualidades de hierbas medicinales y tomó nota de la capacidad de cambiar sus características a través de cultivo. Dioscorides, médico griego (100 D. C.) registró, recopiló y almacenó el uso de hierbas medicinales y es considerado por muchos como el representante más importante de la ciencia de

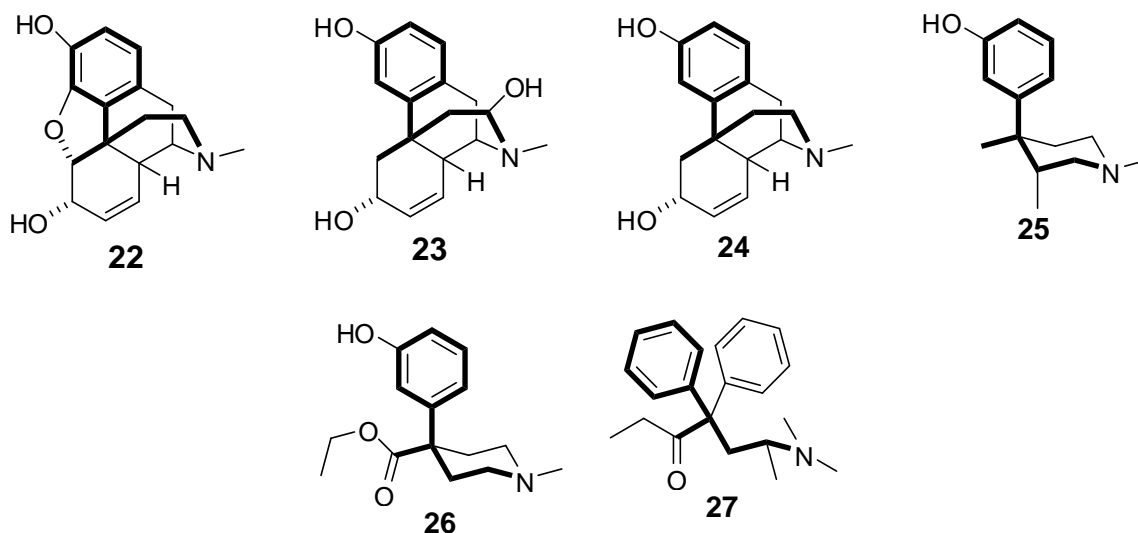
los medicamentos herbolarios. Galeno (130–200 D. C.), practicó y enseñó farmacia y medicina en Roma y publicó no menos de 30 libros sobre estos temas.²

En las culturas indígenas de nuestro país también se generaron registros de estas actividades, tal es el caso del código Badiano⁵ y el código Florentino⁵ que fueron recopilados en los siglos XV y XVI.

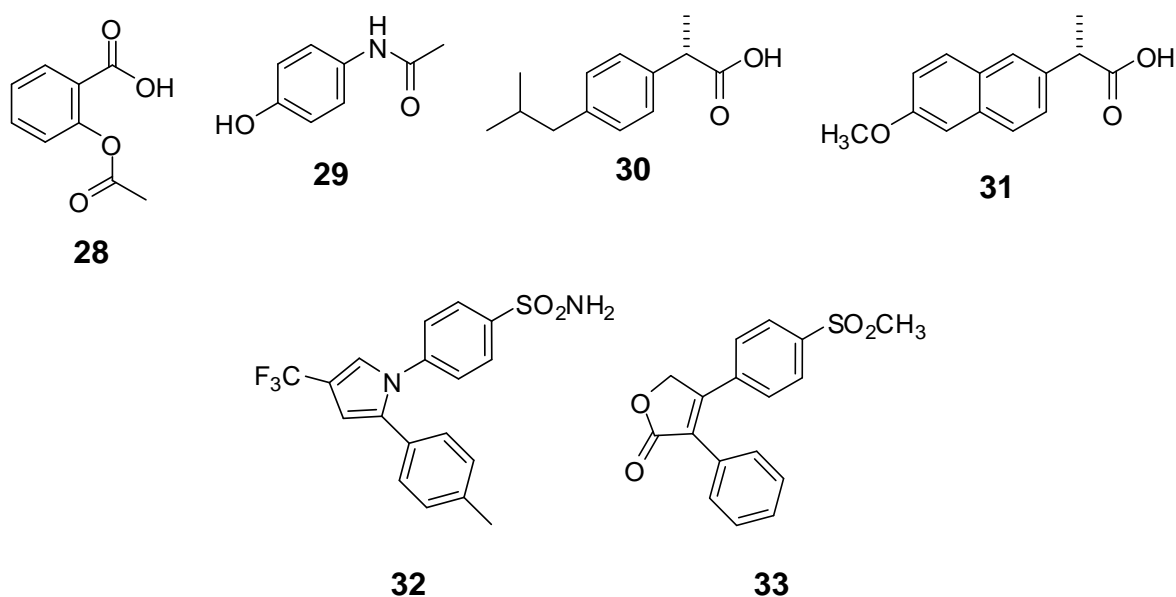
1.2 Descubrimiento de fármacos

En 1785 el Dr. William Withering describió un remedio a partir de *Digitalis purpurea* para tratar la insuficiencia cardíaca.^{6a} Estudios químicos posteriores permitieron la identificación de digitoxina (**21**)⁶ que fue introducida al mercado de fármacos como lanoxin[®] en 1930⁷. Por otra parte, en 1805 Freidrich Serturner logró aislar la morfina (**22**) del opio. Los efectos analgésicos y adictivos de este compuesto motivaron investigaciones que generaron patentes como: levophanol (**23**), morfina (**24**), benzomorfan (**25**), meperidina (Demerol[®] **26**), metadona (**27**)⁸ que permitieron identificar el farmacóforo (**negro**). Todos ellos se unen al receptor μ -opioide que es un transmisor que regula el dolor del sistema nervioso central, su desarrollo pretendió evitar la dependencia generada por **22**, estos derivados **23-27** cuentan con más actividad (potencia) y los signos de adicción son menores.



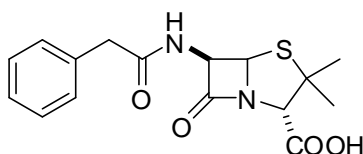
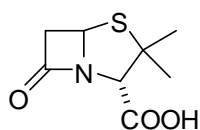
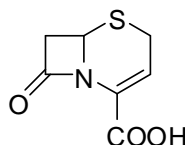
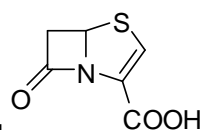
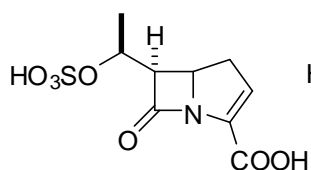
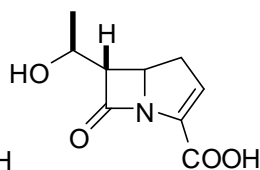
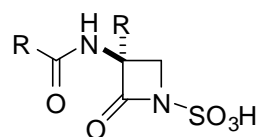


En 1897 la compañía Bayer anunció una de las síntesis más primitivas para obtener un fármaco: la síntesis del ácido acetil salicílico (**28**),⁹ a partir del ácido salicílico obtenido de los sauces. Posteriormente modificaciones moleculares y estudio de análogos así como modelos *in vitro* de la enzima cicloxigenasa (COX-1 y COX-2) generaron compuestos como el acetaminofen (**29**), ibuprofen (**30**) y naproxen (**31**),⁶ y en este siglo estructuras novedosas como celebrex (**32**) y vioxx (**33**).¹⁰



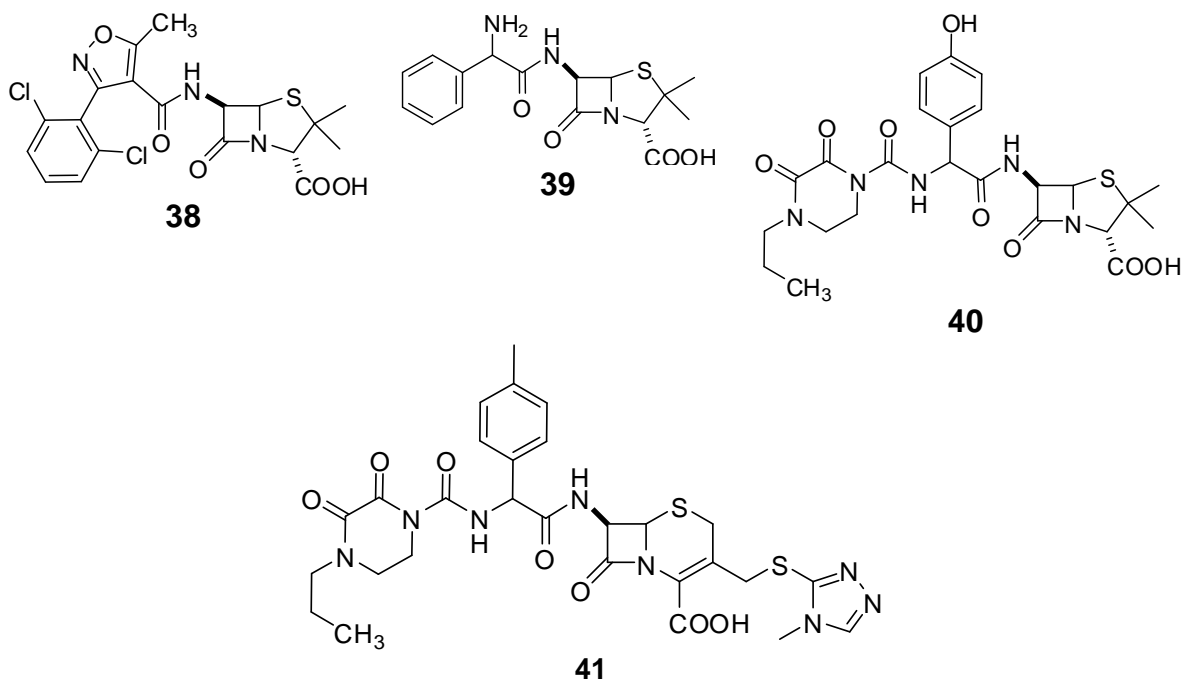
Se puede mencionar que uno de los detonantes más importantes para la búsqueda de fármacos a partir de fuentes naturales fue el aislamiento y

purificación de la penicilina G (**31**)¹¹ en 1928. Cualquiera que haya sido la causa, científica o hallazgo afortunado, esta molécula permitió que se obtuvieran fármacos a partir de fuentes naturales y que pudieran administrarse en dosis precisas. Actualmente, las β -lactamas se obtienen por semi-síntesis y por síntesis total, se pueden agrupar en penicilinas (**32**), cefalosporinas (**33**), cefenems (**34**), carbapenems (**35**), penems (**36**) y monobactams (**37**), el mecanismo de acción se encuentra bien identificado: las β -lactamas inhiben la acción de las transpeptidasas encargadas de producir el péptido glicano que forma la pared celular de la bacteria

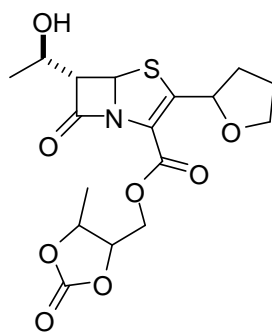
**31****32****33****34****35****36****37**

El primer problema de las penicilinas en un primer caso fue su labilidad en medio ácido, resuelto con la inserción de un anillo de isoxazol (dicloxacilina **38**) o con grupo amino (ampicilina **39**). Otra optimización y la más importante es la resistencia bacteriana la cual se abordó proporcionando impedimento estérico en la posición del grupo bencilo, como en el caso de la piperacilina (**40**) los resultados obtenidos fueron una penicilina con un gran espectro de actividad tanto para bacterias Gram positivas como negativas. Esta misma optimización también se

aplica a las cefalosporinas como en el caso de la cefoperazona (**41**) una cefalosporina de tercera generación.



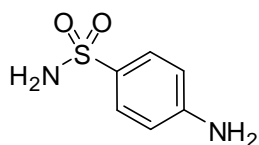
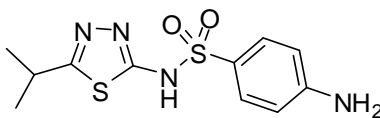
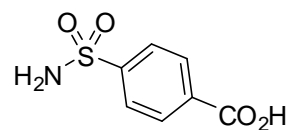
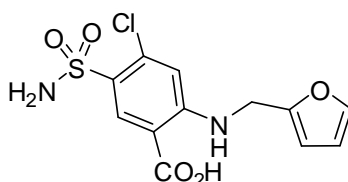
Actualmente las β -lactamas siguen generando patentes a la industria farmacéutica, tal es el caso del profármaco faropenem daloxato (**42**) introducido por Daiichi Suntory Pharma en 2004.¹²



42

Después de la penicilina la industria farmacéutica inició una gran expansión tanto para el aislamiento de productos naturales como para la síntesis de compuestos. En 1935 se determinó la estructura de la sulfanilamida (**43**) como antibiótico, cuyo

estudio minucioso generó patentes de estructuras relacionadas como: IPDT (**44**) (hipoglicémico 1942), carzenida (**45**) (diurético 1949) y furosemida (**46**) (antihipertensivo 1957). Estos descubrimientos marcan el inicio de síntesis de compuestos con potencial uso medicinal.¹³

**43****44****45****46**

Durante 1940-1985 el estudio de productos naturales para el desarrollo de fármacos fue una de las herramientas más usadas por compañías farmacéuticas, algunos de los logros más notables se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Productos naturales aislados entre 1970 y 1989 y que llegaron a ser fármacos en 1981–2006.

| Líder, año, tipo | Origen | Descubridor Lugar | Nombre del fármaco y año de lanzamiento |
|---|----------------|--------------------------------|--|
| Validamicina, 1970, Oligosacárido | Actinobacteria | Takeda (JAP) | Acarbose, 1990 Voglibose, 1994 |
| Midecamicina, 1971, Macrólido | Actinobacteria | Meiji (JAP) | Miocamycin, 1985 |
| ácido pseudomonico, 1971, Policétido | Bacteria | Beecham (UK) | Mupirocin, 1995 |
| Taxol, 1971, diterpeno | Planta | Res Triangle Inst/NIH (USA) | Paclitaxel, 1993 Docetaxel, 1995 |
| Cephamicina C, 1971, β-lactámico | Actinobacteria | Lilly (USA) | Moxalactam, 1982 Cefotetan, 1984 Cefbuperazone, 1985 |
| Coformicina, 1974, Nucleótido | Actinobacteria | Inst Microbial Chem (JAP) | Pentostatin, 1992 |
| Echinocandina B, 1974, Cyclopéptido | Hongo | Ciba-Geigy (SWI) | Caspofungin, 2001 Micafungin, 2002 Anidulafungin, 2006 |
| Mizoribine, 1974, | Hongo | Toyo (JAP) | Mizoribine, 1984 |

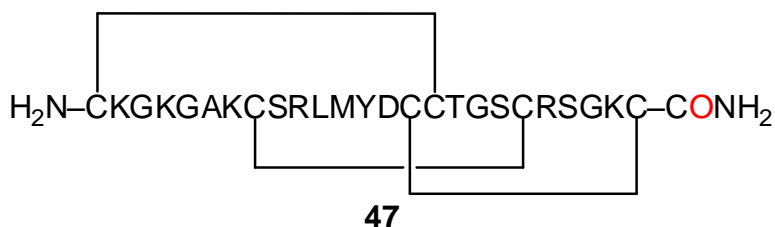
| Nucleótido | | | |
|--|----------------|--|---|
| Rapamicina, 1974, policétido | Actinobacteria | Ayerst (CAN) | Sirolimus, 1999 Everolimus, 2004 Zotarolimus, 2005 |
| Compactina, 1975, policétido | Hongo | Sankyo (JAP) | Lovastatin, 1984 Simvastatin, 1988 Pravastatin, 1989 Fluvastatin, 1994 Atorvastatin, 1997 Cerivastatin, 1997 Pitavastatin, 2003 Rosuvastatin, 2003 |
| Ciclosporina A, 1975, ciclopéptido | Hongo | Sandoz (SWI) | Ciclosporin, 1983 |
| Lipstatina, 1975, Policétido | Actinobacteria | Roche (SWI) | Orlistat, 1987 |
| Bestatina, 1976, Péptido | Actinobacteria | Inst Microbial Chem (JAP) | Ubenimex, 1987 |
| Tienamicina, 1976, β -lactámico | Actinobacteria | Merck (USA) | Imipenem, 1985 Meropenem, 1994 Panipenem, 1994 Faropenem, 1997 Biapenem, 2002 Ertapenem, 2002 Doripenem, 2005 |
| Artemisinina, 1977, sesquiterpeno | Planta | Qinghaosu Res Grp (PRC) | Artemisinin, 1987 Artemether, 1987 Artenusate, 1987 Arteether, 2000 |
| Forskolin, 1977, diterpeno | Planta | Hoechst (IND) | Colforsin, 1999 |
| Plaunotol, 1977, diterpeno | Planta | Sankyo (JAP) | Plaunotol, 1987 |
| Avermectina B1a, 1979, policétido | Actinobacteria | Kitastato Inst (JAP)/Merck (USA) | Ivermectin, 1987 |
| SQ26,180, 1981, β -lactámico | Actinobacteria | Squibb (USA) | Aztreonam, 1984 Carumonam, 1988 |
| Spergualina, 1981, péptido | Bacteria | Inst Microbial Chem (JAP) | Gusperimus, 1994 |
| Arglabin, 1982, sesquiterpeno | Planta | Inst Phytochem (USSR) | Arglabin, 1999 |
| FK506, 1984, Policétido | Actinobacteria | Fujisawa (JAP) | Tacrolimus, 1993 |
| Daptomycina, 1986, ciclodesipeptido | Actinobacteria | Lilly (USA) | Daptomycin, 2003 |
| Calicheamicina g1, 1988, policétido | Actinobacteria | Lederle (USA) | Gemtuzumab, 2000 |

Current Opinion in Chemical Biology **2008**, 12:306–317

Dos de los últimos fármacos llegados al mercado directamente de productos naturales se encuentran el Ziconotide® (**47**) en 2004, el cual es una toxina peptídica aislada del veneno de un cono marino (*Conus magus*), único en su tipo, bloqueador de los canales del calcio tipo N, que regulan la liberación de neurotransmisores responsables del procesamiento medular del dolor.¹⁴ De otro organismo marino tropical, *Ecteinascidia turbinata*, se obtuvo el citotóxico trabectedin® (**48**) aprobado en Europa en 2007.^{14a}



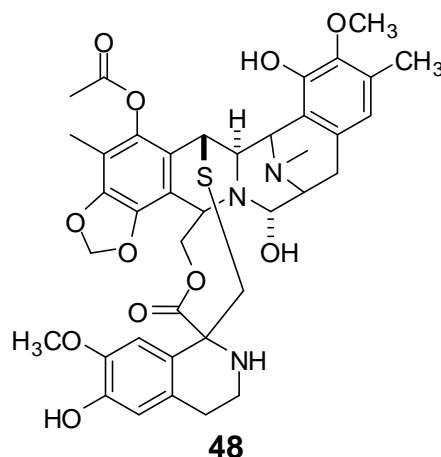
Conus magus



Abreviaciones de amino ácidos: A, Ala; C, Cys; D, Asp; G, Gli; K, Lis; L, Leu; M, Met; R, Arg; S, Ser; T, Thr; Y, Tir



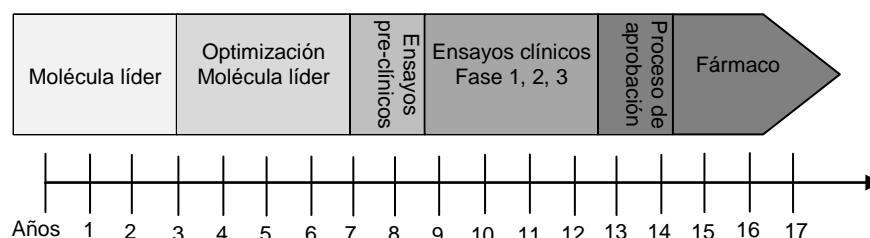
Ecteinascidia turbinata



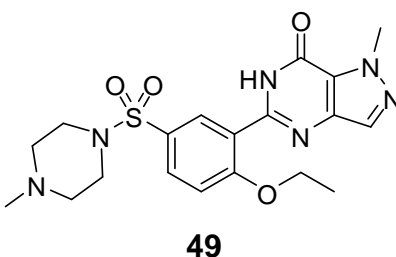
El camino que transita una molécula líder para convertirse en un fármaco, es extenso como se puede apreciar en la Tabla 1, este proceso dura entre 10 años y 20 años, debido a los estudios necesarios para su aprobación.

Cuando el compuesto líder se identifica se debe optimizar su propiedades de farmacodinámicas y de farmacocinéticas. Las primeras se abordan principalmente mediante la obtención de análogos estructurales sintéticos, estos se diseñan mediante metodologías establecidas por química medicinal (homologación,

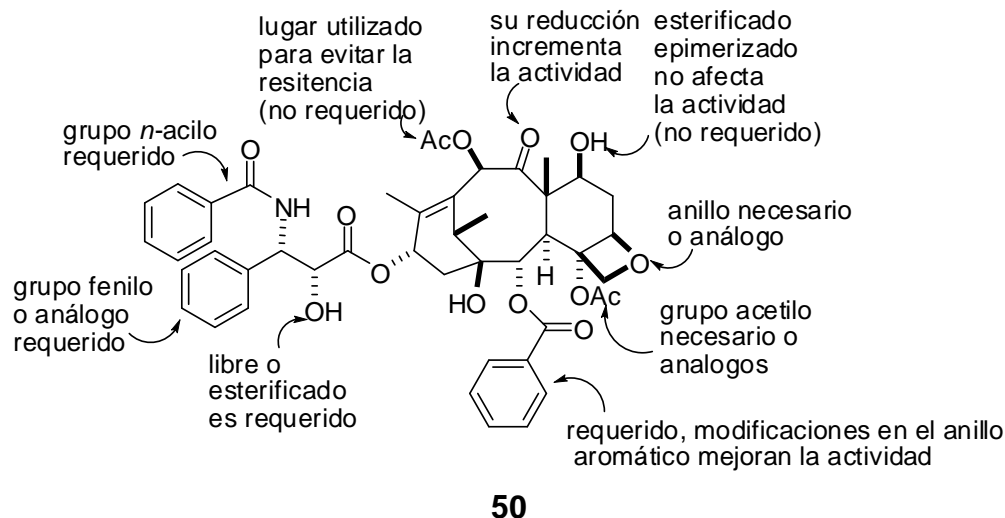
vinilogación, isosteros, bioisósteros, 1D, 2D, 3D-QSAR, etc.) las modificaciones están encaminadas a la obtención de una nueva entidad química más activa y que su síntesis química pueda satisfacer la demanda. Las propiedades farmacocinéticas son: vía de administración, forma de absorción, toxicidad, tiempo de vida media, vía de excreción, interacciones metabólicas, ubicación del sitio activo en el cuerpo o agente, ¿fármaco o pro-fármaco? etc. y deben considerarse junto con las propiedades fármaco dinámicas. Cuando la optimización termina ahora se debe evaluar si la nueva entidad química es segura y eficaz, entonces comienza la fase **pre-clínica**. Antes de ser evaluado el compuesto en humanos se debe ensayar en modelos animales, superando seis tipos de pruebas (depende el tipo de fármaco que se busque) que son: toxicidad aguda, sub-aguda y crónica, mutagenicidad potencial, teratogenecidad potencial y carcinogenecidad potencial. Después de superar estas pruebas se tiene ahora un candidato para estudios clínicos. La **Fase 1** consiste evaluar la seguridad del fármaco mediante la observación detallada de los efectos adversos en un grupo reducido de individuos sanos (25-45). La **Fase 2** consiste en evaluar la eficacia y seguridad del fármaco entonces se utiliza el compuesto un grupo mayor de individuos enfermos (20-150) De igual manera la observación detallada de efectos adversos es primordial. La **Fase 3** consiste en evaluar el mayor número posible de individuos que manifiesten la enfermedad (de cientos a miles) existen protocolos muy bien establecidos como doble-ciego, multi-centro, placebo-controlado, ensayos clínicos aleatorios (RCT). Si un compuesto supera a la fase 3 se introduce al mercado actualmente, a la farmacovigilancia de fármacos disponibles en el mercado se le denomina **Fase 4**.¹⁵



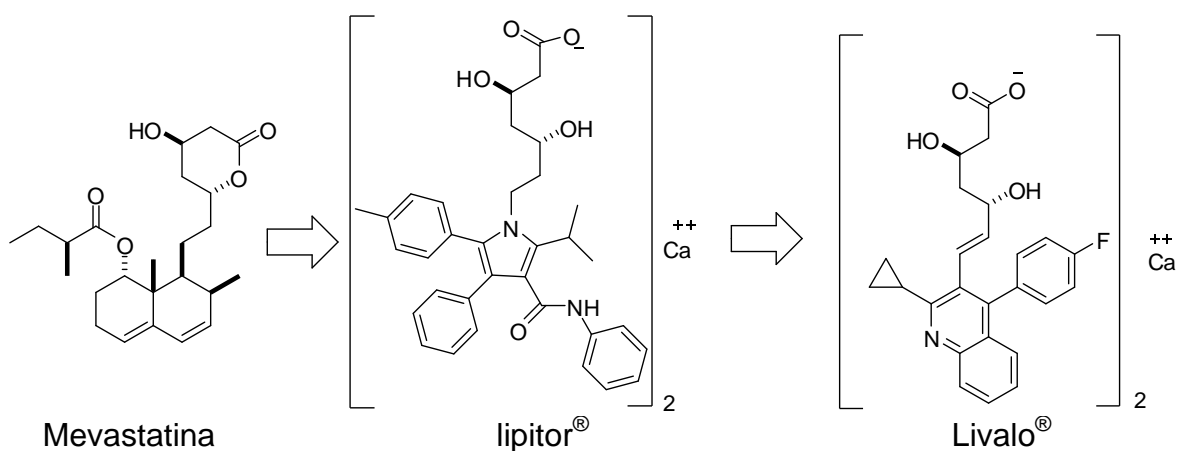
Este desarrollo es tan minucioso y detallado que el fin para el cual las moléculas fueron diseñadas puede cambiar, tal es el caso del sildenafil (**49**) cuya evaluación inicial fue como fármaco para controlar la hipertensión y para controlar la angina de pecho, y superó las pruebas de Fase 1, sin embargo en la Fase 2 no generó los resultados esperados, así que se reiniciaron los estudios en Fase 1 a dosis mayores y se encontró que **49** bloquea la enzima fosfodiesterasa-5, generando relajación del músculo liso del cuerpo cavernoso e incrementando el flujo de sangre, unos años más tarde **49** conocida como la píldora azul se lanzó al mercado como *viagra*®.^{15a}



El proceso de optimización permite identificar perfectamente la parte de la molécula que es el farmacóforo y que es irremplazable; esta debe estar presente en la molécula para que no pierda su actividad, por ejemplo en el caso del taxol (**50**) un fármaco para el tratamiento del cáncer de seno, prácticamente toda la estructura es requerida para mantener un compuesto activo, y solamente las modificaciones en dos posiciones no reducen la actividad.^{15b}



Contrario al caso anterior es el caso de la mevastatina fármaco que reduce los niveles de colesterol, durante el desarrollo farmacológico de la mevastatina se determinó que el sistema de la decalina pudo ser reemplazado radicalmente hasta desarrollar derivados estructuralmente tan diferentes como el lipitor[®], el fármaco de mayor venta en la última década y cuya patente vence en 2011, y livalo[®] introducido al mercado en 2009 y cuya patente seguirá siendo válida hasta 2019.



1.3 Perspectiva actual de los Productos Naturales

Históricamente los productos naturales o derivados de éstos han generado la mayoría de los fármacos que actualmente son usados en el mercado, sin embargo métodos alternativos, modernos y “racionales” para el descubrimiento de fármacos han puesto en declive la investigación sobre ellos en las compañías farmacéuticas. El rastreo de alto rendimiento de librerías sintéticas, estudio inteligente, robotización, avances en secuenciación genética que permiten la manipulación de rutas metabólicas, ofrecen recursos más económicos. El hecho es que en los últimos veinte años hay un decremento sustancial en la aprobación de nuevos fármacos, la tendencia es a disminuir, siendo que, hasta 1985, la tendencia era contraria¹. Es conocido que de alrededor de 7000 estructuras de policétidos, 20 son fármacos, lo que da un porcentaje de eficiencia de 0.3% a los

productos naturales, muy superior con respecto al estudio de alto rendimiento de librerías sintéticas que es de 0.001%.¹

En la industria farmacéutica los nuevos métodos de síntesis química (combinatoria, fase sólida y multi-componentes) permiten el análisis masivo de cientos de compuestos sintéticos puros y de entidades químicas nuevas, que en su caso requieran una modificación química pequeña, favorecen un “rastreo más amigable” aunado con que la demanda del compuesto estaría cubierta. Sin embargo, el análisis *in vitro* de compuestos sintéticos no necesariamente garantiza su actividad en un organismo vivo, en adición de una mayor probabilidad de tener efectos tóxicos o adversos.¹⁶

En comparación en el estudio de productos naturales las dificultades son otras y podemos englobarlas en las siguientes: la abundancia del recurso natural, el análisis y reproducibilidad del ensayo, el procedimiento de aislamiento y la elucidación estructural compleja. En general los productos naturales siempre se han considerado demasiado “sucios” lo cual provoca que los métodos modernos de exploración molecular no permitan su evaluación en mezclas. Además la actividad farmacológica de los compuestos naturales sólo en raras ocasiones alcanzan el rango de nanomolar, siendo generalmente en la escala micromolar o incluso milimolar. Casi siempre, la cantidad del compuesto activo está por debajo del 1% de rendimiento.¹⁷ Se puede mencionar que la industria farmacéutica actualmente mantiene un modelo que excluye a los productos naturales para el diseño y desarrollo de fármacos.

Por otra parte, las estimaciones para el número total de las especies vivas varían de 200 a 100 millones, con una reclamación de 30 millones sólo para los insectos. Por lo tanto, el número de productos biosintéticos y enzimas pendiente de ser examinada es enorme. La cantidad de fármacos derivados de productos naturales es superior a la de los fármacos derivados de compuestos sintéticos y la cantidad de recursos naturales por examinar dista mucho de terminarse.

Adicionalmente surgen nuevas estrategias¹⁸ para el hallazgo de productos naturales que al día de hoy han estado “escondidos”, siendo una de las más

prometedoras la **genómica**, que permite el desarrollo de nuevos procesos enzimáticos de biosíntesis mediante la activación o desactivación de genes clave, este tipo de manipulación permite la obtención de análogos de productos naturales de alto interés sintético y farmacéutico.^{18a} La biología molecular y las relaciones simbióticas, despiertan interés ya que pueden revelar rutas metabólicas “escondidas”, las claves para lograr innovar los métodos de búsqueda es la interdisciplinariedad,¹⁸ y el uso de los nuevos equipos de espectrometría de masas de detección táctica y transferencia de disociación electrónica que proporcionan nuevas herramientas que permiten la secuenciación de cadenas peptídicas¹⁹ en menos tiempo, conjuntamente con la secuenciación de DNA en tiempo real.^{19a}

Es necesario seguir estudiando las fuentes naturales para el hallazgo de nuevas entidades químicas, o en su caso nuevas actividades farmacológicas no descritas de compuestos conocidos. En el presente trabajo se describe el hallazgo de una molécula líder a partir de plantas de *Geranium* endémicas del estado de Hidalgo.

2. ANTECEDENTES

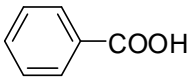
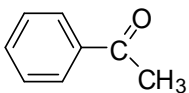
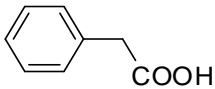
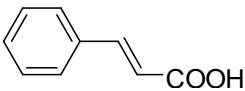
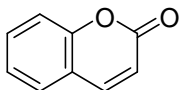
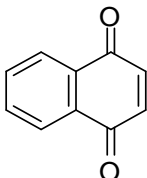
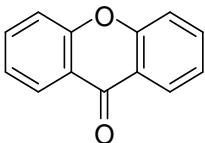
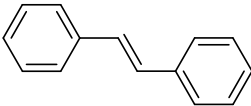
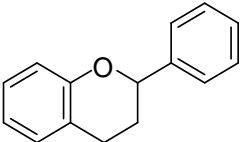
2.1 Productos Naturales

Los productos naturales se pueden definir como aquellos compuestos orgánicos presentes en la naturaleza y que se pueden aislar de organismos vivos tales como: animales, algas, bacterias, hongos y plantas.²⁰ En general se han considerado como productos naturales a los metabolitos secundarios, los cuales se conoce que son compuestos que no forman parte de los procesos vitales en los organismos que los contienen, y son de distribución limitada y específica para una especie o grupo de especies. Estudios biológicos han determinado que la mayoría de metabolitos secundarios desempeñan funciones tales como: defensa contra predadores y/o patógenos, agentes alelopáticos, atrayentes a los polinizadores o a los dispersores de las semillas, protectores de luz UV, etc.²¹

Los metabolitos secundarios se pueden englobar en tres grandes familias de compuestos: policétidos (acetogeninas), terpenos y alcaloides.²⁰ A continuación se abundará un poco sobre las familias de ácidos fenólicos y flavonoides, ya que los metabolitos mayoritarios aislados e identificados en el presente trabajo corresponden a esta categoría.

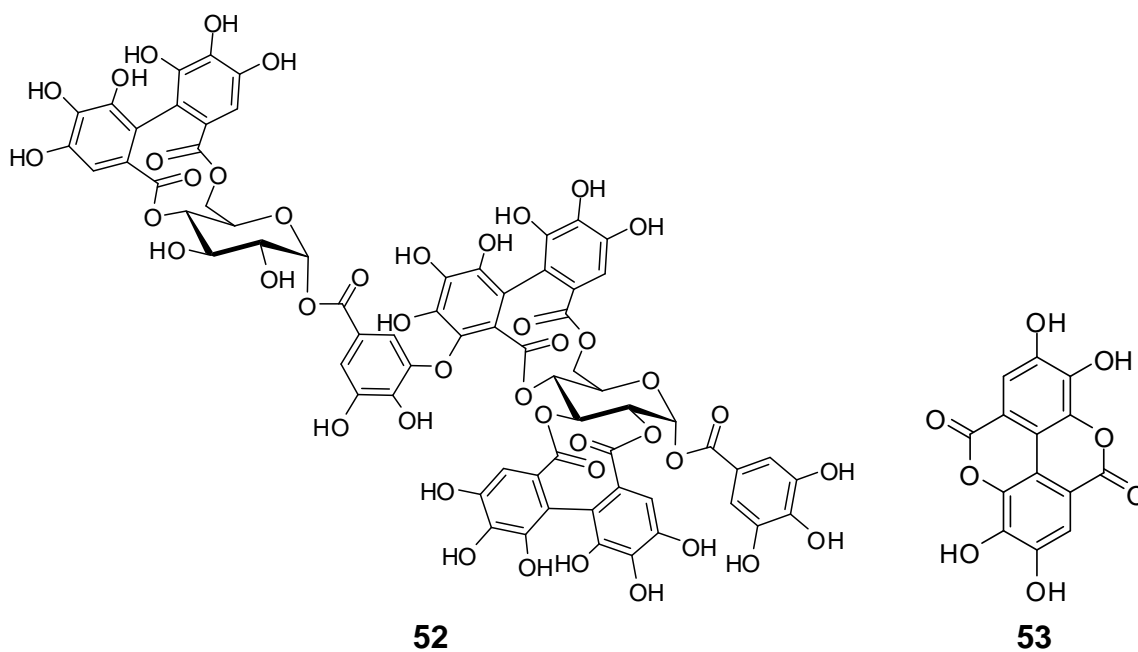
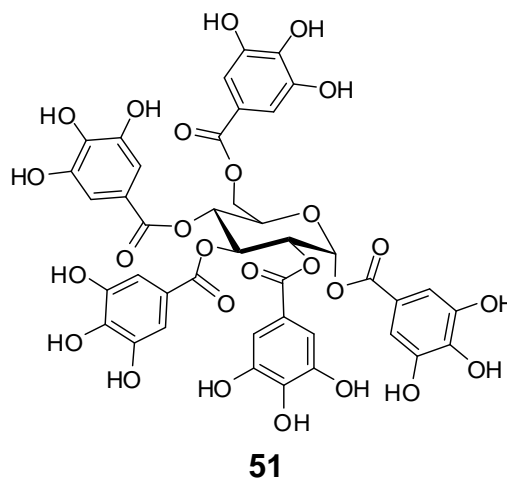
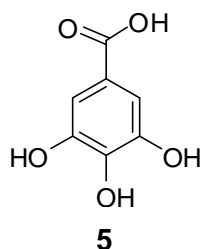
Dentro de la ruta metabólica de shikimato, se localizan un grupo de compuestos denominados fenólicos, cuya característica es que contienen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unidos a él. La biosíntesis propuesta y aceptada de los flavonoides establece que son producidos mediante dos rutas shikimato y acetato malonato. Una clasificación de estos compuestos se muestra en la Tabla 2, basada en el número de anillos aromáticos y carbonos.²²

Tabla 2. Estructuras base de compuestos fenólicos y polifenólicos.

| Clasificación | Núm. carbonos | Estructura base. |
|-------------------------|----------------------|---|
| Ácidos fenólicos | C_6-C_1 |  |
| Acetofenonas | C_6-C_2 |  |
| Ácidos fenilacéticos | C_6-C_2 |  |
| Ácidos hidroxicinámicos | C_6-C_3 |  |
| Cumarinas | C_6-C_3 |  |
| Naftoquinonas | C_6-C_4 |  |
| Xantonas | $C_6-C_1-C_6$ |  |
| Estilbenos | $C_6-C_2-C_6$ |  |
| Flavonoides | $C_6-C_3-C_6$ |  |

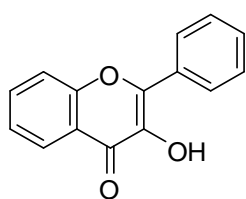
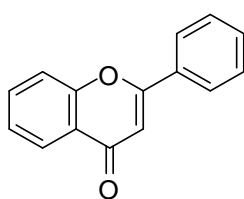
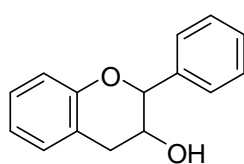
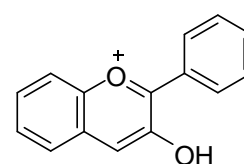
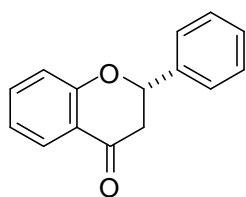
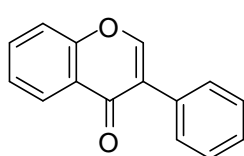
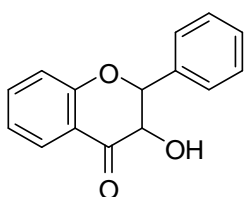
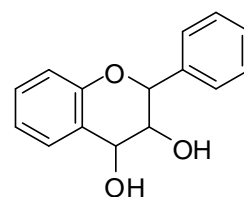
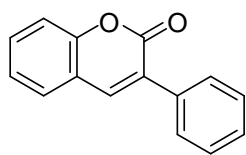
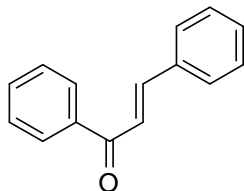
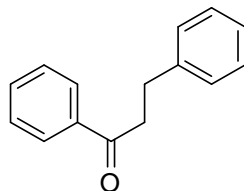
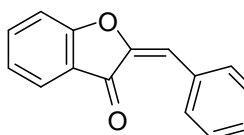
2.1.1 Ácidos fenólicos

El compuesto más común de esta familia es el ácido gálico (**5**), y se puede aislar de varias familias como Euphorbiaceae, Rubiaceae y Geraniaceae. De manera habitual se encuentra esterificado con azúcares formando los galotaninos (ejemplo pentagalaloíl glucosa, **51**)²³ que a su vez son precursores de los elagitaninos (ejemplo sanguina, **52**), de cuya hidrólisis se obtiene el ácido elágico (**53**). Son de poco consumo debido a que sólo se localizan en algunos productos como fresas, frambuesas, zarzamoras, granadas, guayabas, nueces, avellanas, vino tinto y especialmente en chocolate.²²

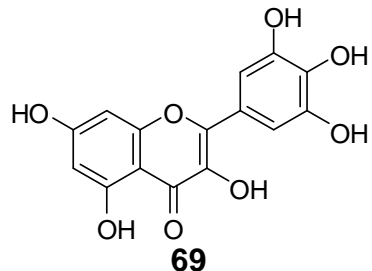
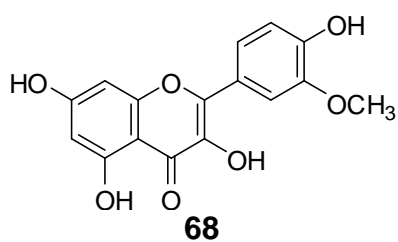
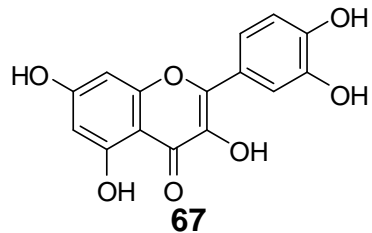
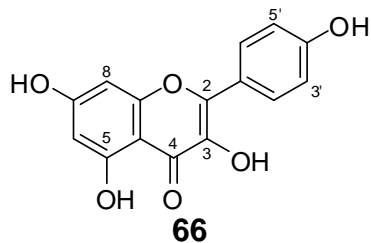


2.1.2 Flavonoides

La mayoría de los flavonoides provienen del reino vegetal, y sus principales subclases son: flavonoles (**54**), flavonas (**55**), flavan-3-oles (**56**), antocianidinas (**57**), flavanonas (**58**), isoflavonas (**59**), dihidroflavonoles (**60**), flavan-3,4-dioles (**61**), cumarinas (**62**), chalconas (**63**), dihidrochalconas (**64**) y auronas (**65**).¹⁹

**54****55****56****57****58****59****60****61****62****63****64****65**

Los flavonoles **54** son los más distribuidos en plantas. Sus variaciones estructurales se encuentran bien documentadas, dentro de los más comunes se localizan el kaempferol (**66**), quercetina (**67**), isoramnetina (**68**) y miricetina (**69**).²⁴



La sustitución más frecuente es por O-glucósidos en la posición 3; sin embargo, también son abundantes sustituciones en 5, 7, 3', 4', y 5'. La variedad de azúcares conjugados a éstos es enorme tan sólo para Kaempferol (**66**) se encuentran reportados alrededor de 200 compuestos distintos. Es normal consumir cantidades importantes de ellos en la dieta ya que se encuentran prácticamente en todos los vegetales, frutas y bebidas naturales.²⁵

2.2 Actividades biológicas de especies de *Geranium*

La actividad biológica de las especies de *Geranium* está bien documentada.²⁶ El uso tradicional más frecuente es para disminuir diarreas, como por ejemplo *Geranium canescens*, *G. robertianum*²⁷ y *G. incanum* que mostró importante actividad antidiarréica en ratones inducida por aceite de castor, la dosis activa fue de 400 mg/K, por vía oral, adicionalmente se evaluó la toxicidad aguda del extracto usando dosis de 4 g/K, por vía oral y no causó la muerte de ningún individuo del grupo.²⁷

El extracto etanólico de partes aéreas de *Geranium sibiricum* Linne reguló la actividad antiinflamatoria en células de mastocitos tipo 1 (HMC-1) responsables de la producción de histamina y se propuso su uso como agente antiinflamatorio en enfermedades alérgicas.²⁸ En un estudio previo se logró el aislamiento de una glico-proteína (18 KDa) de la cual se evaluó su actividad antioxidante y hepatoprotectora.^{28a} *Geranium robertianum* cuenta con varios reportes de su actividad biológica y aun se continúa estudiando la especie. Recientemente su capacidad de captura de radicales libres (antioxidante) fue relacionado a la actividad antiinflamatoria.²⁹ En un estudio de actividad antibacterial de tres geranios se identificó a *Geranium pratense* como el más activo.³⁰ De esta misma especie se demostró experimentalmente su eficacia terapéutica en padecimientos inflamatorios, usando 100 mg/Kg de su extracto acuoso, y se obtuvo efectos similares con respecto a una dosis de 10 mg/Kg de indometacina.³¹

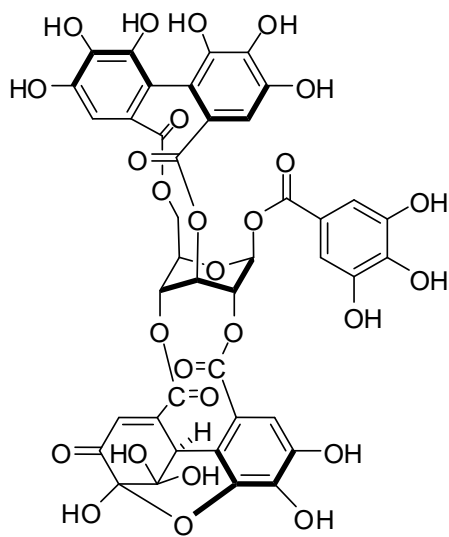
Por otra parte *Geranium carolinianum* demostró actividad antimicrobiana contra las bacterias *Ralstonia solanacerum*, *Streptomyces scabies* y *Streptomyces acidiscabies*.³² También se observó actividad antiviral contra el virus de la hepatitis B usando el extracto acetónico acuoso de las partes aéreas.³³

El extracto metanólico de las raíces de *Geranium mexicanum* fue evaluado por su capacidad antiprotozoaria contra *Trichomonas vaginalis*, cuya DL₅₀ fue de 5.8 µg/mL, comparando su efecto con metrodinazol que tiene una DL₅₀ de 0.035 µg/mL.³⁴

Los extractos de *Geranium sibirum* demostraron que pueden ser útiles en el tratamiento de cáncer de colon.³⁵

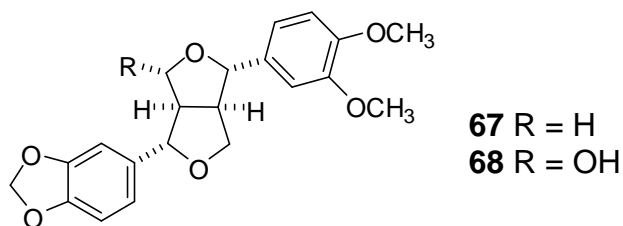
2.3 Compuestos aislados de especies de *Geranium*.

El tanino geraniina (**8**) es aceptado como uno de los taninos hidrolizables mayoritarios en los extractos polares de estas especies. Recientemente, se describió la capacidad de **8** para reducir los niveles de lípidos de baja densidad (LDL).³⁶

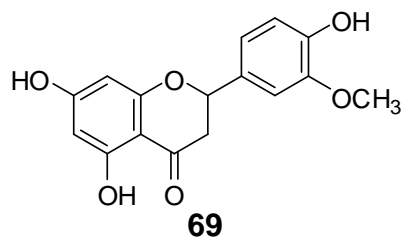


8

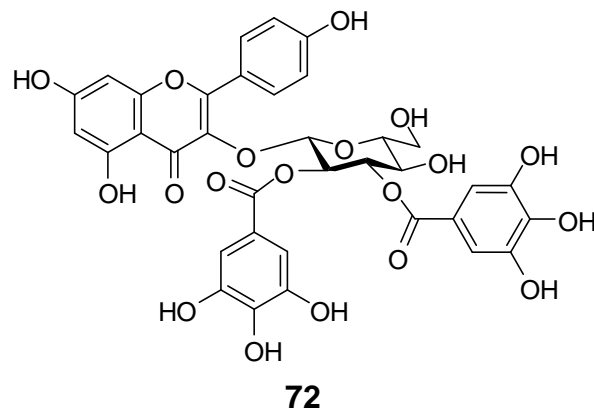
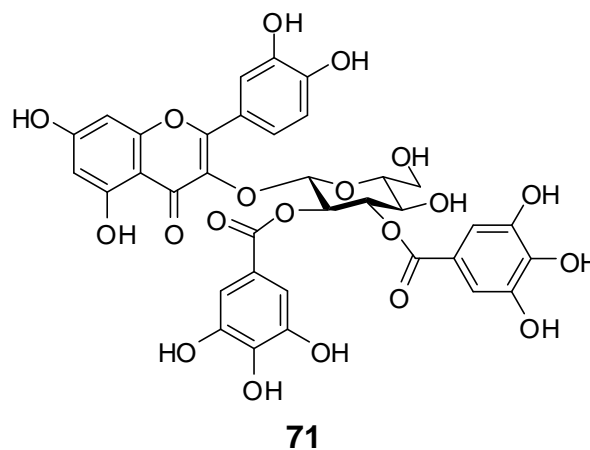
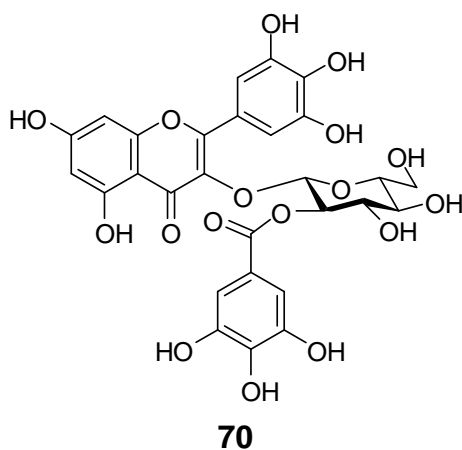
De *Geranium thunbergi* han sido descritos recientemente nuevos lignanos, denominados Kobusinas 1 (**67**) y 2 (**68**).³⁷



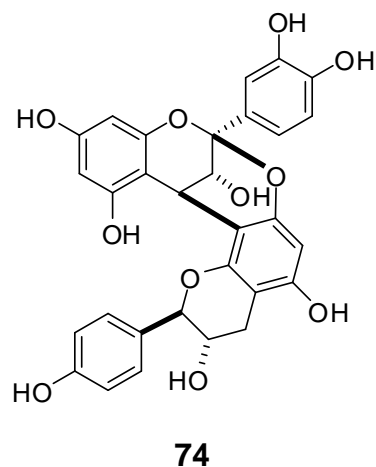
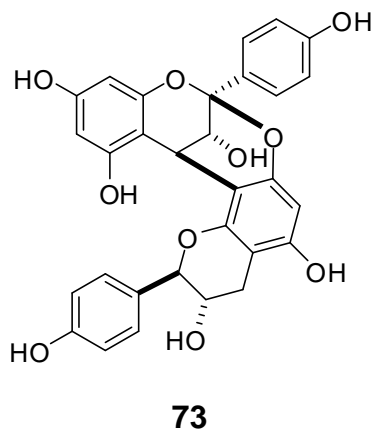
Por otra parte, una nueva flavona denominada como homoerlodictiol (**69**) fue aislada de *Geranium robertianum*.²⁹



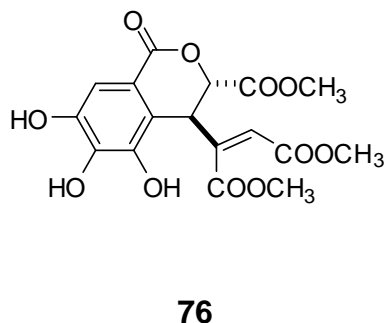
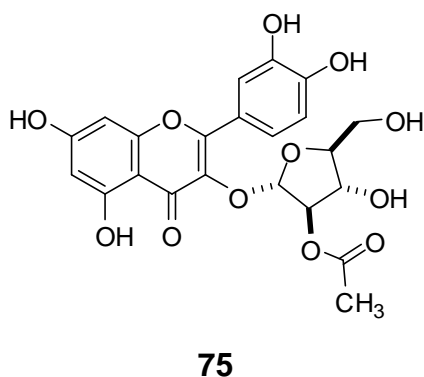
La característica principal de los flavonoides presentes en estas especies es la glicosidación con azúcares que contienen ácido gálico. Se han identificado derivados de miricetina (**70**)³⁸, quercetina (**71**) y kaempferol (**72**)³⁹ aislados de *G. pratense* y *G. pyreniacum*, respectivamente. Los derivados **71** y **72** fueron evaluados contra los parásitos, *Leishmania major* y *Leishmania donovani*, siendo el compuesto **71** el más activo.³⁹



El extracto metanólico de las raíces de *Geranium niveum* presentó actividad anti protozoaria contra *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* cuya IC₅₀ fue de 8.5 y 20.46 µg/mL, respectivamente.⁴⁰ De este extracto se obtuvieron las geraninas A (**73**) y B (**74**).^{40a}



Recientemente, en nuestro grupo de trabajo describimos el aislamiento y caracterización de ocho compuestos presentes en los extractos antioxidantes (acetato de etilo y metanol) de las partes aéreas de *Geranium bellum*, en donde el compuesto 3-O-α-L-(2''-O-acetil)arabinofuranósido de quercetina (**75**) y dehidrochebulato de trimetilo (**76**), fueron descritos por primera vez en el género.⁴¹



Se ha demostrado que el uso de plantas de *Geranium* se debe principalmente a la presencia de compuestos del tipo flavonoide y taninos descritos en los puntos 2.2 y 2.3 de este documento; resaltaremos los trabajos de *G. mexicanum*,³⁴ *G. niveum*⁴⁰ y *G. pyreniacum*,³⁹ en los que se demuestra actividad antiprotozoaria. Las especies *G. niveum* y *G. mexicanum* son endémicas de México. El estudio de *G. pyreniacum* dirigido hacia la inhibición de parásitos tipo *Leishmania* permitió

proponer estudios de especies endémicas del estado de Hidalgo, que puedan ser útiles en padecimientos causados por parásitos, como el caso de *Trypanosoma cruzi* causante de la enfermedad de Chagas.

2.4 Enfermedad de Chagas

Dentro de las enfermedades causadas por parásitos de tipo flagelados se encuentra la Tripanosomiasis (enfermedad de sueño en África), la Leishmaniasis y la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana).⁴²

La enfermedad de Chagas es una infección ocasionada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, es un padecimiento de gran importancia en el Continente Americano y se distribuye desde Estados Unidos hasta Argentina y Brasil. Se calcula que aproximadamente 8-9 millones de personas la padecen, cada año 14000 personas mueren a causa de ella y se estima que 25 millones más están expuestas a contraerla, la incidencia se estima en 300 000 casos nuevos por año.^{42a} El principal vector de contagio son insectos hematófagos del género *Triatoma* (chinche besucona), sin embargo algunos animales sirven como reservorio tales como: ratas, tlacuaches, armadillos y ratones de campo.⁴³ Existe evidencia de que transfusiones de sangre, transmisión congénita, leche materna y trasplante de órganos son otras formas de infección.^{42,43}

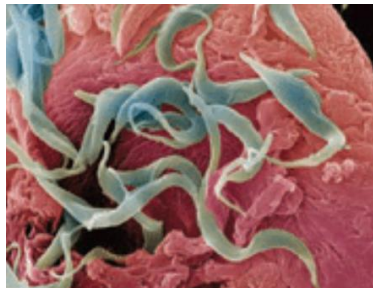


Imagen de tejido infectado con *T.cruzi*.

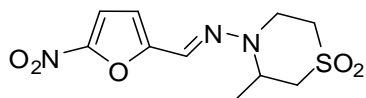
La enfermedad de Chagas se caracteriza por las tres fases siguientes.

Fase o periodo agudo: regularmente asintomático, aunque en algunos casos, frecuentemente en niños, se caracteriza por edemas en la piel y conjuntivitis (signo de Romaña), dura aproximadamente de 15 a 20 días.

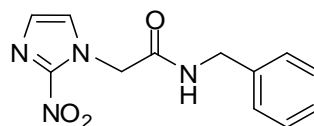
Etapa indeterminada o de latencia: asintomática en la cual el parásito invade lentamente las células de los tejidos y puede durar varios años o toda la vida.

Etapa crónica: se presenta daño irreversible en el corazón, esófago, intestino, etc. y se caracteriza por un tamaño exagerado en los tejidos afectados. En esta fase la enfermedad es incurable.

Cabe mencionar que existen fármacos usados para este padecimiento; sin embargo son efectivos sólo en fase aguda, tal es el caso de nifurtimox (**77**) y benznidazol (**78**).



77



78

Ambos fármacos producen anorexia, efectos tóxicos neurológicos, debilidad, pérdida de peso, vómito, pérdida de memoria y depresión de la médula ósea.⁴⁴

Debido a la limitación en el tratamiento farmacológico para esta enfermedad existe una necesidad urgente para el desarrollo de nuevos fármacos o candidatos para utilizarse contra este padecimiento.

2.5 Diseño de fármacos y posibles blancos terapéuticos de *T. cruzi*

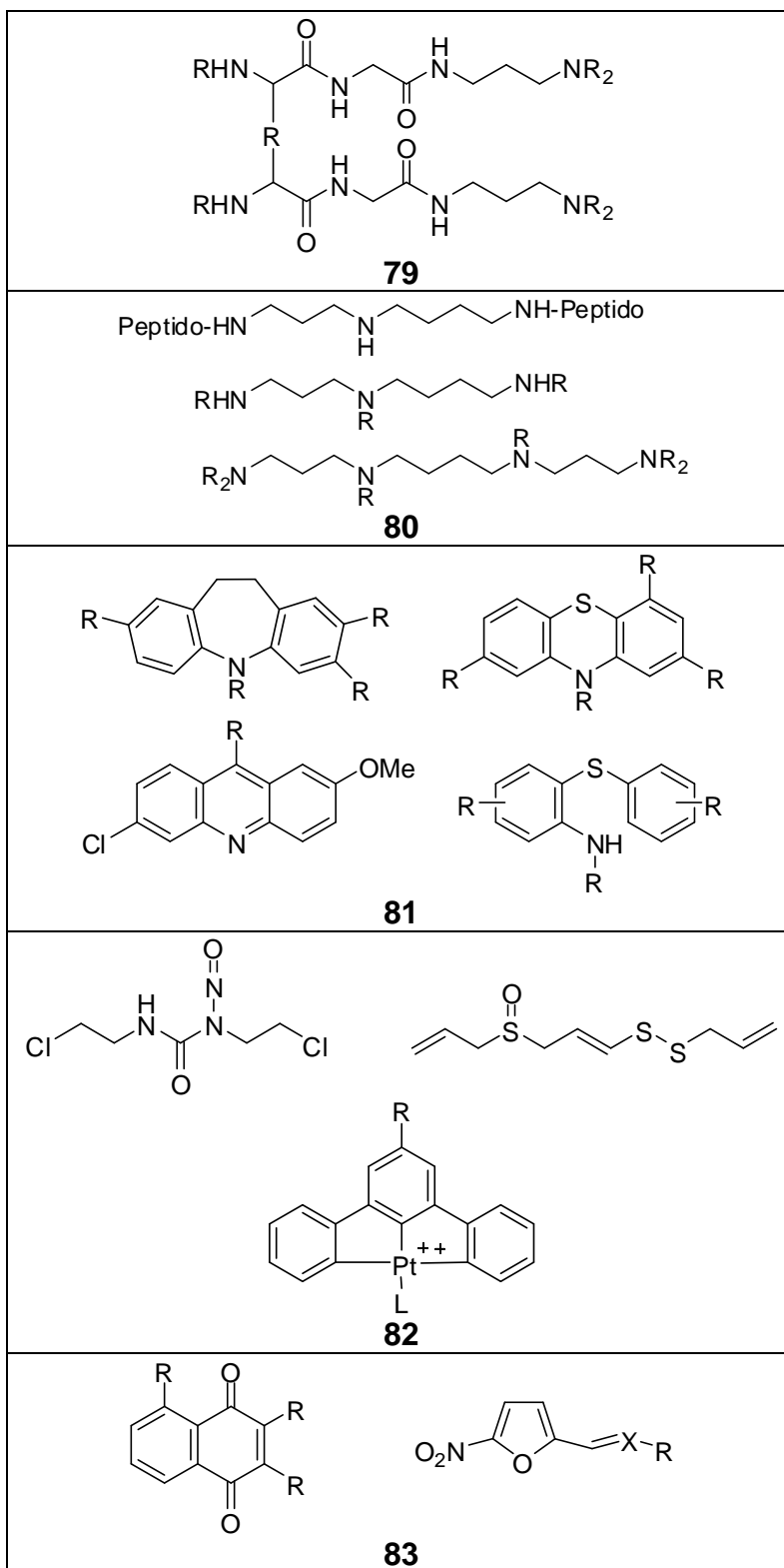
Los avances en la bioquímica de las funciones básicas de *T. cruzi* han permitido la identificación de posibles blancos metabólicos para el diseño racional de fármacos, entre estos blancos se incluyen enzimas y procesos metabólicos como:⁴⁵

1. Tripanotiona reductasa
2. Cisteinas proteasas
3. Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa
4. Triosa fosfato isomerasa
5. Dihidrofolato reductasa
6. Metabolismo de esteroides

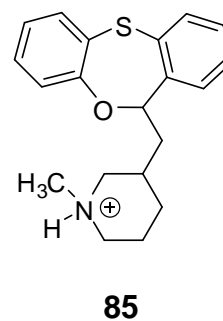
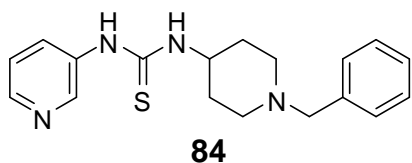
2.5.1 Tripanotiona reductasa

Uno de los blancos más explorados para el control de *T. cruzi* es la tripanotiona reductasa (TryR), cuya función es mantener el equilibrio en el sistema tiol-redox en la defensa contra oxidantes. La actividad de la enzima parasitaria es similar a la de su huésped: glutatióna reductasa (GR). Ambas enzimas participan en el mecanismo de protección celular contra radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno (ROS). La lista de inhibidores desarrollados para esta enzima puede clasificarse en cinco grupos (Tabla 3) sustratos análogos (**79**), inhibidores peptídicos (poliaminas **80**), compuestos tricíclicos (**81**), inhibidores irreversibles (**82**) y sustratos subversivos (**83**).^{45,46} También se pueden anexar compuestos como alcaloides y lignanos, sin que hasta el momento su selectividad y desarrollo haya ofrecido ya un fármaco, debido principalmente a que en modelos animales las moléculas no son tan activas y requieren mayor optimización.⁴⁶

Tabla 3. Estructuras de compuestos desarrollados para inhibir la tripanotona reductasa.

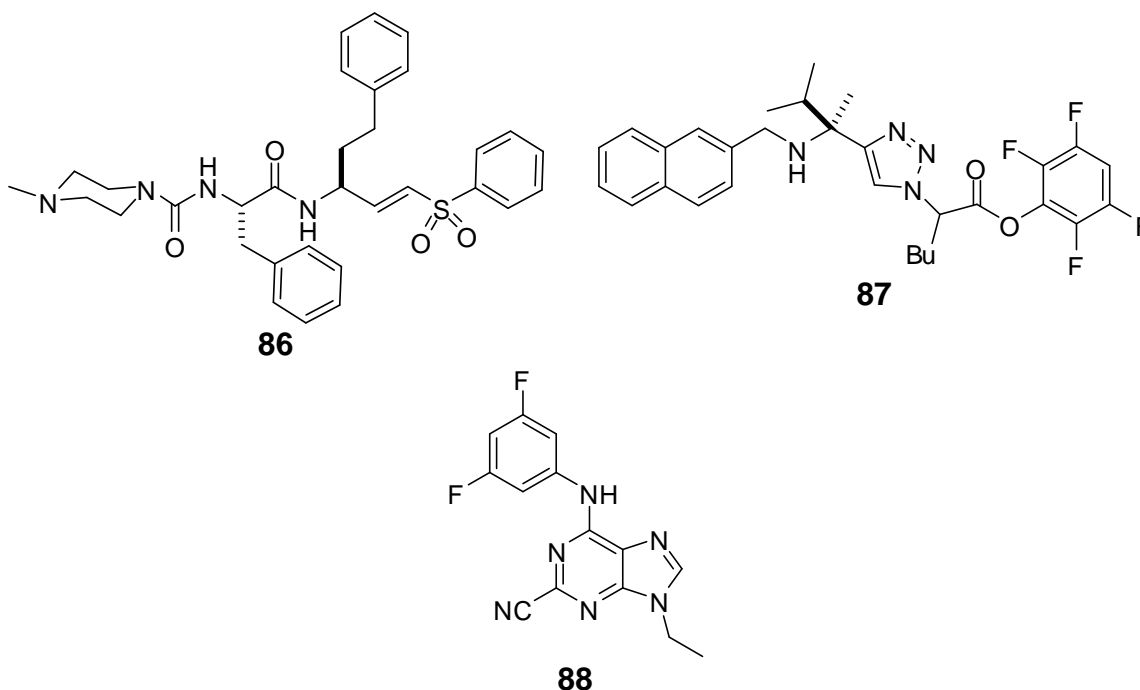


En los estudios reportados recientemente para el hallazgo de nuevas entidades químicas para inhibir esta enzima destaca el compuesto **84** con una IC_{50} 1 μ M, obtenido por HTS⁴⁵ y ZINC04128838 (**85**) con una IC_{50} 0.1 μ M. Este compuesto se obtuvo a partir de una nueva estrategia de cálculos teóricos y modelado molecular (DOKING) en el sitio activo del compuesto.⁴⁶



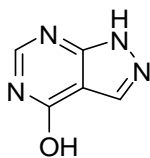
2.5.2 Cisteínas proteasas

Las cisteínas proteasas están involucradas en dos aspectos de las interacciones huésped-parásito: nutrir al parásito y la penetración en los tejidos de su huésped. Las cisteínas proteasas son las enzimas más abundantes en la mayoría de protozoarios. Están reportadas con mayor frecuencia y mejor identificadas en los tripanosomátidos. La enzima mejor caracterizada en *T. cruzi* es la cruzipaína, también conocida como cruzaina o GP57/51, la cual está expresada en los cuatro estadios principales del ciclo biológico del protozoario, siendo más activa en la forma de epimastigote. La lista de alquilantes irreversibles (covalentes) desarrollados incluye: halometilcetonas, diazometilcetonas, alcoximetilcetonas, epóxidos, vinil sulfonas, sólo por mencionar algunos tipos.⁴⁷ Quizá el más importante inhibidor desarrollado es APC-3316, CRA-3316 o K-777 (**86**),^{47a} que para el año 2003 ya se encontraba en estudios Fase 1 y 2, otro inhibidor promisorio es el compuesto **87** de naturaleza no peptídica.^{47b} Una entidad química nueva con una IC₅₀ de 0.01 µM, es el derivado de purina **88**.^{47a}

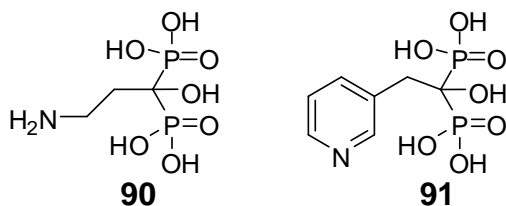


2.5.3 Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa

Los tripanosomátidos son deficientes metabólicamente para producir nucleótidos, para obtener estos compuestos esenciales los toman de su huésped. La enzima hipoxantina-guanina fosforilbositransferasa es responsable de obtener guanina de nucleótidos. El fármaco allopurinol (**89**) fue estudiado por décadas para inhibir a esta enzima, lamentablemente se conocen al menos dos cepas principales de *T. cruzi* y dependiendo la cepa es la susceptibilidad. De los últimos estudios clínicos para validar el uso de **89**, en donde se administraron 900 mg/día por 60 días, se demostró que no fue efectivo para eliminar la parasitemia en sangre,⁴⁸ y debido a lo contradictorio de sus resultados la OMS no recomendó su uso para el control de la parasitemia en fase crónica.^{48a}

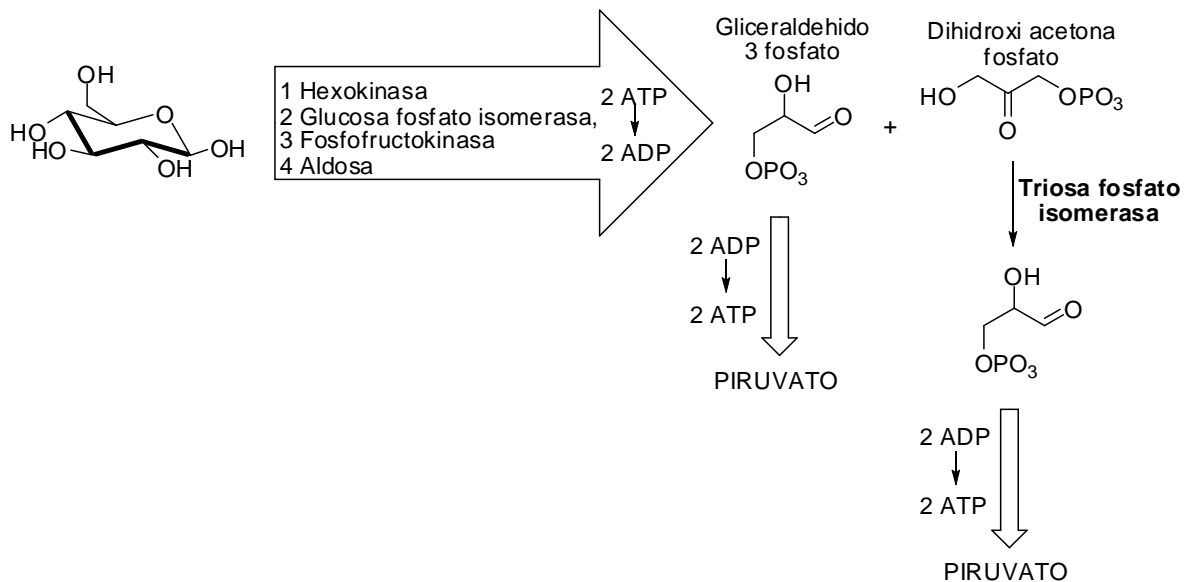
**89**

Otros inhibidores que lograron la eliminación de un 90% de la parasitemia en modelos animales fueron los bisfosfonatos residronato (**90**) y pamidronato (**91**) con dosis de 10 mg/Kg/Día, esta es una familia de fármacos (alrededor de 14 homólogos) que son usados en desórdenes como hipercalcemia y osteoporosis. Su mecanismo de acción descrito es inhibiendo la farnesil pirofosfato sintasa responsable de formar tri, di y mono fosfato nucleótidos, inhibiendo la unión de purinas con fosfatos.^{48b}

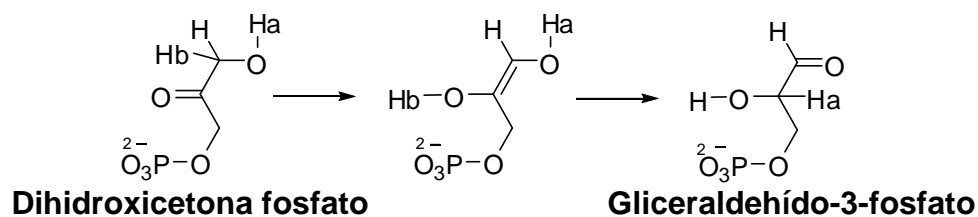
**90****91**

2.5.4 Triosa fosfato deshidrogenasa

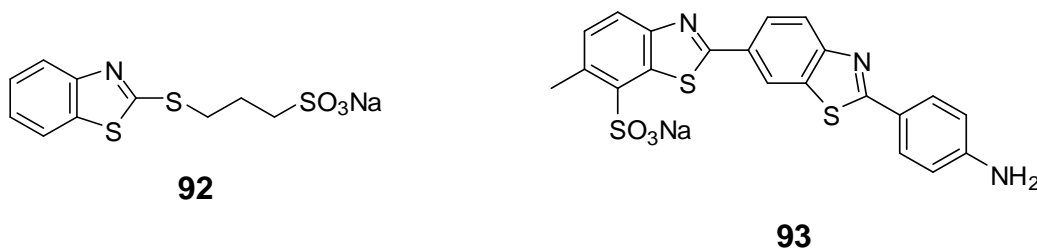
La glicólisis de los tripanosomátidos es un metabolismo diferente a la los mamíferos. Se estima que intervienen en el proceso de 7 a 8 enzimas, las cuales se localizan dentro de glicosomas. La degradación oxidativa de glucosa no es completa como en el caso de los mamíferos. En el proceso intervienen cuatro pasos enzimáticos consumiendo dos unidades de ATP para formar dos derivados: el Gliceraldehído 3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato. La intervención de la triosa fosfato isomerasa es un punto clave para que el proceso glicolítico genere la ganancia energética esperada: al realizarse este paso y posteriores intervenciones enzimáticas se obtienen 4 ATP por cada dos unidades de azúcar consumidas.⁴⁹



La triosa fosfato isomerasa (TIM) interviene en el paso de dihidroxiacetona fosfato a gliceraldehído 3-fosfato, lo cual sucede en el quinto paso de la ruta glicolítica de *T. cruzi*.



Se conocen diferencias significativas entre la enzima del parásito y la humana⁵⁰ debido a ello es posible identificar moléculas que tengan selectividad con la enzima del parásito exclusivamente. Existen pocos reportes de compuestos que sean capaces de inactivar la enzima con selectividad adecuada, en uno de ellos, dos compuestos derivados de benzotiazol **92** y **93** fueron identificados como los más activos de una serie de 10 estudiados.⁵¹

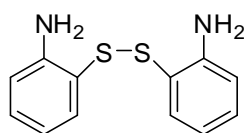


Estos inhibidores también inhiben parcialmente la actividad de la enzima humana como se puede apreciar en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones de compuestos para inhibir el 50% de la actividad de la enzima (IC₅₀) del parásito y la Humana.⁵¹

| compuesto | IC ₅₀ TIM <i>T. cruzi</i> | IC ₅₀ TIM Humana |
|-----------|--------------------------------------|-----------------------------|
| 92 | 33 μM | 422 μM |
| 93 | 8 μM | 1600 μM |

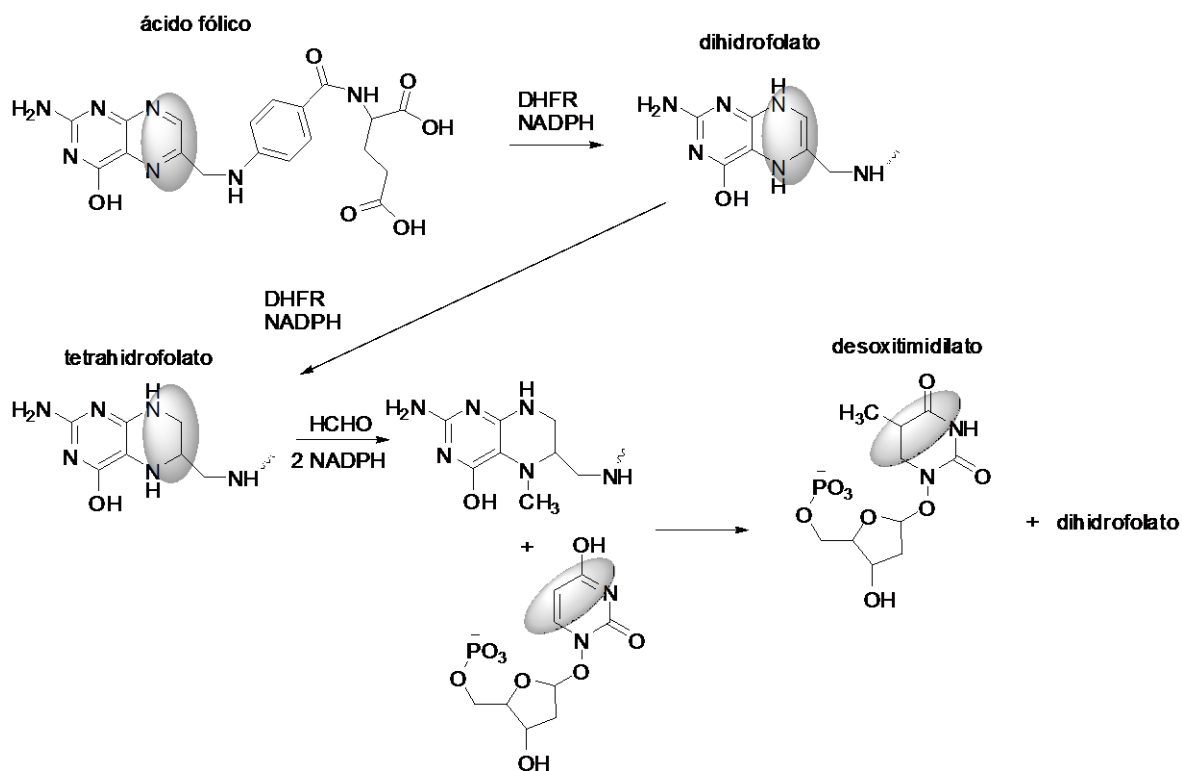
Otro inhibidor recientemente descrito es ditiodianilina (**94**) que presentó el 50% de inhibición enzimática de 0.2 a 1.5 μM, en cinco enzimas aisladas de diferentes cepas de *T. cruzi*. Igual que sus antecesores sintéticos también genera inhibición de la enzima humana a IC₅₀ de 98 μM.⁵²



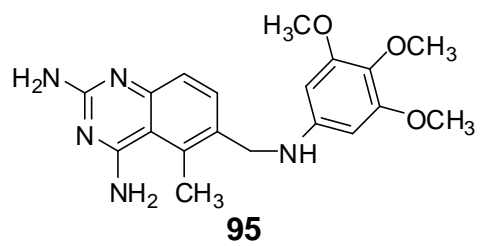
94

2.5.5 Dihidrofolato reductasa

Es una enzima trascendental para la síntesis de DNA, por lo que se convierte en un blanco prometedor para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Esta enzima cataliza un paso crucial en la única vía para la síntesis de nucleótidos de DNA en *T. cruzi*, su función es catalizar la reducción de folato a dihidrofolato (DHF) y de dihidrofolato (DHF) a tetrahidrofolato (THF) por medio del cofactor NADPH.⁵³ La forma metilada del tetrahidrofolato es usada como donador de un grupo metilo a las bases de pirimidina que forman el desoxitimidilato (dCMP) clave en la formación del DNA.

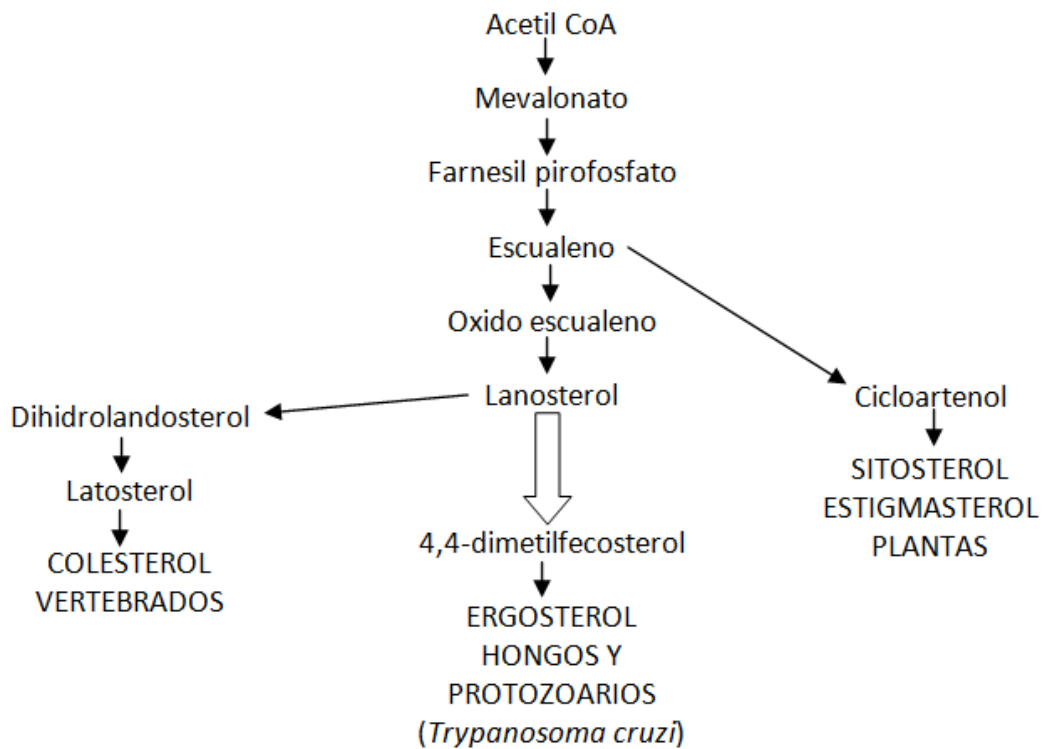


Un fármaco activo para la inhibición selectiva de esta enzima es el trimetexato (**95**) usado para las infecciones de neumonías severas causadas por *Pneumocystis carinii* y *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con VIH, también es usado como anticancerígeno. En un trabajo realizado in vitro con este compuesto se obtuvo una IC₅₀ de 19 a 72 nM,⁵³ a pesar de este resultado no hay reportes en modelo animal o Fase 1.



2.5.6 Metabolismo de esteroides

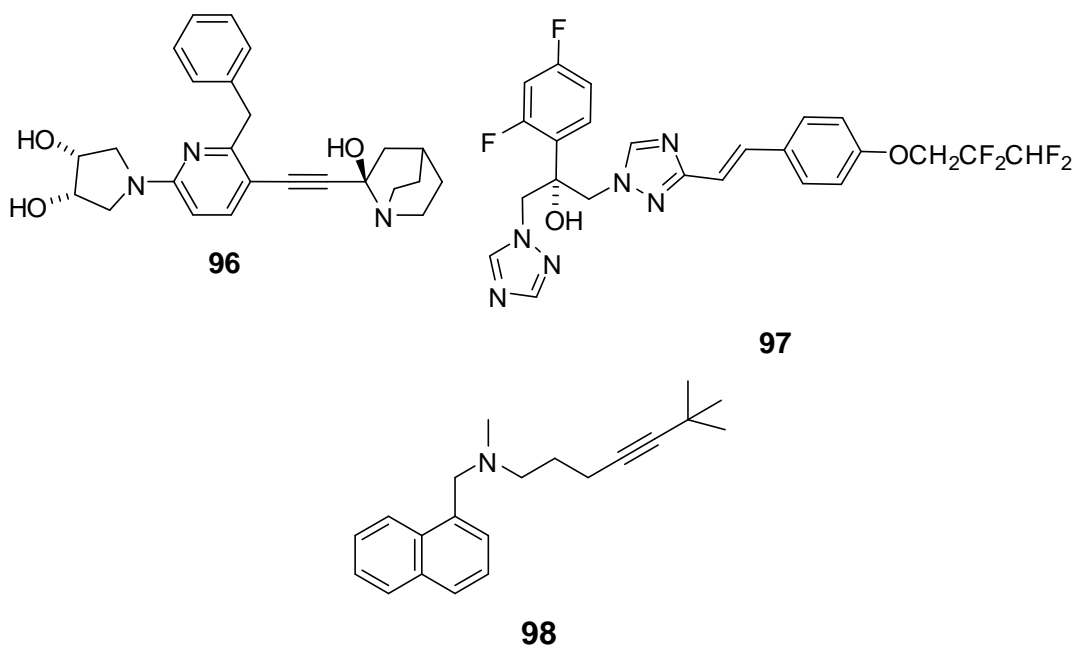
La membrana celular de plantas, vertebrados, hongos y protozoarios requiere para su formación esteroides específicos para lograr la viabilidad celular, cuya ruta biosintética es acetato-mevalonato. En todos los organismos se sigue la misma ruta hasta la formación del escualeno; en ese punto las plantas desarrollaron su propio camino hasta la formación de sitosterol y estigmasterol, por su parte los vertebrados, hongos y protozoarios continúan una misma secuencia de formación de compuestos hasta la producción de lanosterol. En ese punto los vertebrados desarrollan la propia obteniendo colesterol, los hongos y protozoarios generan un camino de compuestos también propio a partir de lanosterol hasta la formación de ergosterol (Esquema 2).



Esquema 2. Rutas de esteroides simplificada las flechas indican más de una reacción. La flecha ancha indica el paso en el que los tripanosomatidos y hongos se diferencian de las demás rutas.

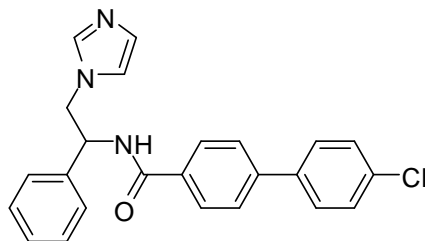
Las diferencias en estas rutas han permitido la identificación de algunos blancos contra hongos y protozoarios: inhibidores de la escualeno sintetasa, inhibidores de la escualeno epoxidasa, inhibidores de la oxidoescualeno ciclasa e inhibidores de la esterol C14 α -demetilasa (CYP51).

Los compuestos que han demostrado mayor capacidad de inhibición de la escualeno sintetasa son E5700 (**96**) y D0870 (**97**). En dosis de 50 mg/Kg/día disminuyeron la parasitemia y la mortalidad.^{54,55} Mientras que para la escualeno epoxidasa el mejor inhibidor es terbinafina (**98**) con una concentración mínima inhibitoria de 1-3 μ M, mostrando un efecto sinérgico con Ketoconazol.⁵⁶

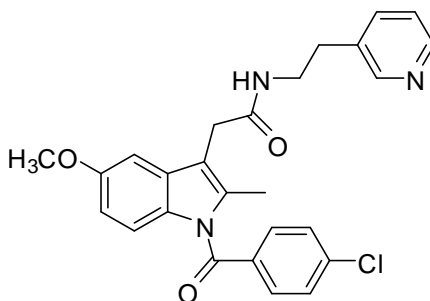


En el caso de la oxidoescualeno ciclasa todos los compuestos obtenidos generan inhibición de la síntesis de colesterol en modelos humanos por lo que su utilización es de alto riesgo.

Uno de los blancos más prometedores para el desarrollo de quimioterapia contra hongos y tripanosomátidos es la enzima esterol C14 α -demetilasa (CYP51) que es exclusiva de estos organismos. El compuesto SDZ285428 (**99**).^{57,58} es un ejemplo de inhibidor de esta enzima.

**99**

En los primeros estudios de inhibición de CYP51, los resultados obtenidos con derivados de azoles (albaconazol, ravuconazol y posaconazol) establecieron a este tipo de compuestos como una potencial alternativa para el tratamiento de infecciones. Dentro de los últimos estudios destaca el realizado por Konkle, en el cual demuestra que un derivado de la indometacina (**100**) es el más activo de una serie de 20 sustancias estudiadas.⁵⁹

**100**

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la limitación en el tratamiento farmacológico para enfermedades parasitarias, tal como la enfermedad de Chagas, existe una necesidad urgente y demandante para el desarrollo de nuevos fármacos para remediar estos padecimientos.

Las plantas del género *Geranium* se han descrito como contenedoras de compuestos polifenólicos (taninos),⁶⁰ algunos de los cuales se han descrito como posibles antiparasitarios,⁶¹ aunque su química refiere también la presencia de flavonoides^{38,39,41} y antocianidinas.^{40a} *Geranium pyreniacum* mostró actividad antilehismánica y se aislaron flavonoides derivados de kaempferol a los que se les atribuyó esta actividad.³⁹ Adicionalmente, dos especies nativas de México se han descrito con capacidad antiprotozoaria: *Geranium niveum*,⁴⁰ y *Geranium mexicanum*.⁶² Por otra parte, existen especies de este género que son nativas del estado de Hidalgo⁶³ y que no cuentan con estudios químicos ni biológicos. En el presente trabajo se planteó el estudio de 3 especies de éste género, con la finalidad de contribuir al conocimiento de su química y a la obtención de sustancias antiparasitarias de origen natural y sintético.

4. OBJETIVO GENERAL

Llevar a cabo el estudio químico de especies de *Geranium* para contribuir al conocimiento de la química del género y obtener nuevos principios activos capaces de inhibir la enzima triosa fosfato isomerasa y que podrían servir como líderes en el diseño racional de fármacos.

4.1. Objetivos específicos

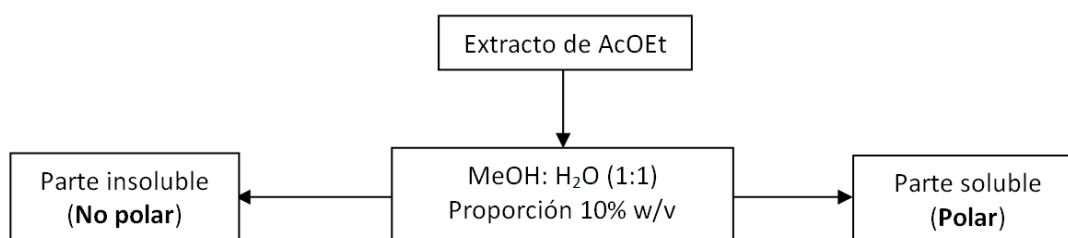
- Aislar y caracterizar metabolitos secundarios de *Geranium bellum*, *G. potentillaefolium*, *G. seemannii*.
- Evaluar la actividad antiparasitaria de los metabolitos aislados de *Geranium* mediante la inhibición de la enzima triosa fosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*.
- Obtener compuestos líderes para su optimización y diseño de fármacos.

5. RESULTADOS

5.1. Compuestos aislados de raíces de extractos de AcOEt y MeOH

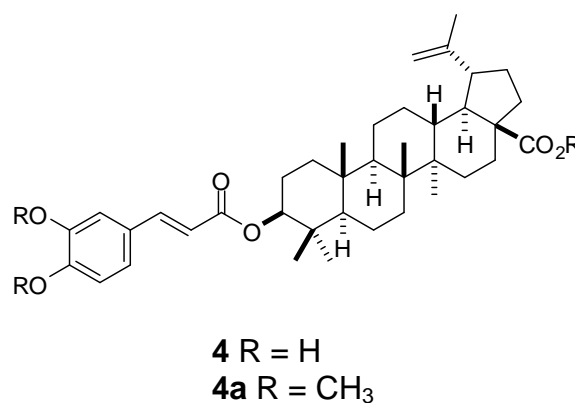
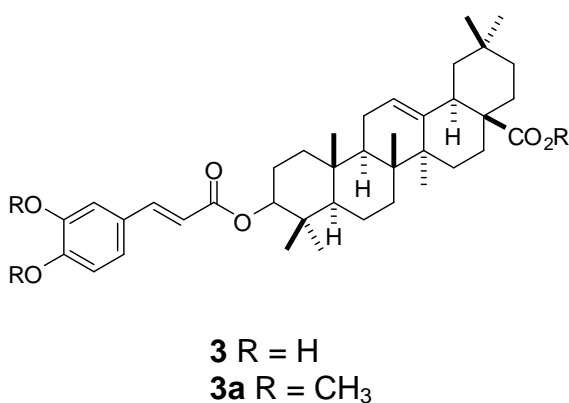
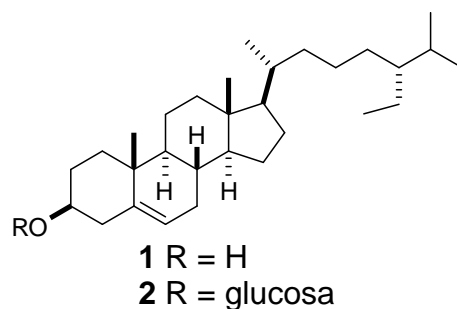
La separación sistemática mediante cromatografía en columna de los extractos de acetato de etilo (EtOAc) y metanol (MeOH) de las raíces de *G. Bellum*, y *G. potentillaefolium*, usando sílica gel o Sephadex LH-20, permitió el aislamiento de β -sitosterol (**1**)²⁶, 3-O- β -D-glucósido de β -sitosterol (**2**)²⁶, una mezcla en proporción 1:1 del ácido 3 β -O-*E*-cafeoiloleanólico (**3**)⁶⁴ y el ácido 3 β -O-*E*-cafeoilbetulínico (**4**)⁶⁴, ácido gálico (**5**)²⁶, galato de metilo (**6**)²⁶, corilagina (**7**)⁶⁵ y geraniina (**8**)⁶⁵.

Para la separación de los compuestos de los extractos de AcOEt de las raíces de *Geranium Bellum*, *G. potentillaefolium* y *G. seemannii*, se usó una partición mediante la metodología descrita en el esquema 1.



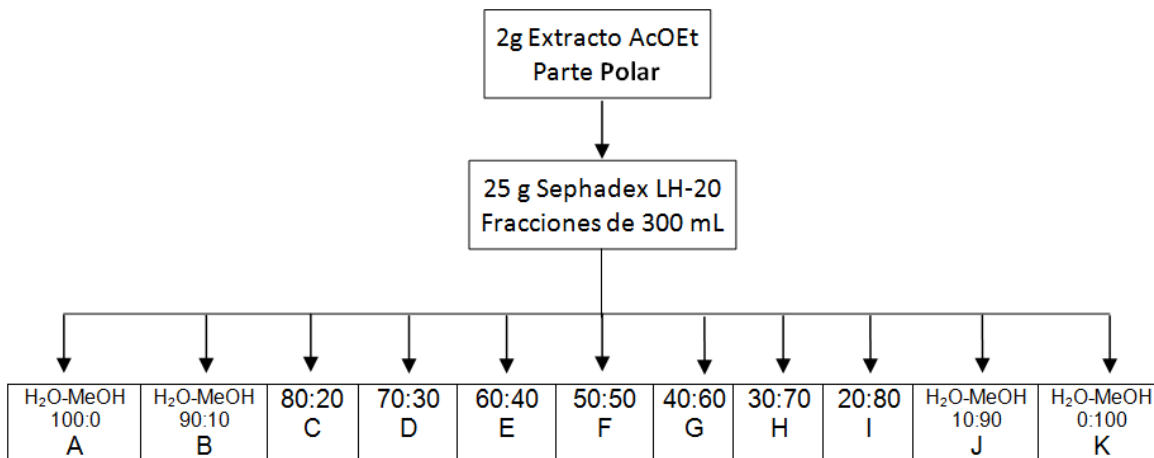
Esquema 1. Estrategia usada para la división de los extractos de las raíces en AcOEt

La parte insoluble del extracto de AcOEt de las raíces denominada “No polar” se separó por cromatografía en gel de sílice utilizando mezclas de *n*-hexano y AcOEt obteniendo los compuestos: β -sitosterol (**1**), 3-O- β -D-glucósido de β -sitosterol (**2**), y una mezcla 1:1 del ácido 3 β -O-*E*-cafeoil oleanólico (**3**) y el ácido 3 β -O-*E*-cafeoil betulínico (**4**)

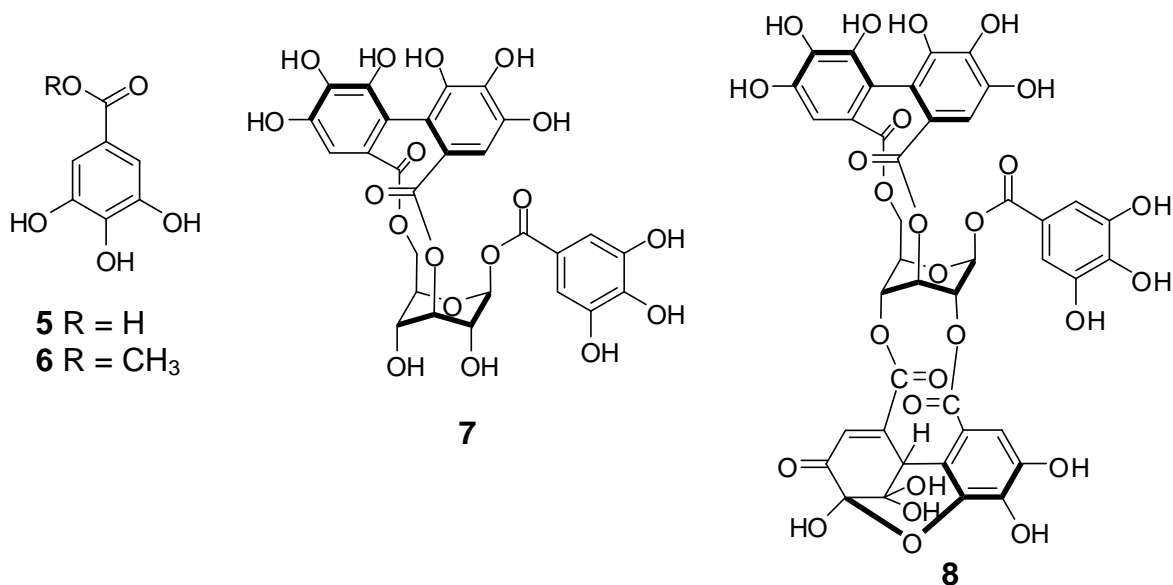


La mezcla de los compuestos **3** y **4** fue tratada con diazometano seguido de una purificación en gel de sílice-AgNO₃ (6:1 w/w) obteniendo los derivados metilados **3a** y **4a**. Debido a que estos compuestos han demostrado importante actividad antiinflamatoria, es necesario resaltar que su rendimiento del extracto crudo se encuentra alrededor de un 10%, además de que es el primer reporte de **4** en el género. Para el caso de *G. seemanii*, usando gel de sílice, sólo fue posible el aislamiento de **2**.

La parte polar de los extractos de AcOEt y el extracto MeOH de las raíces de *G. bellum* y *G. potentillaefolium* se separó por cromatografía en Sephadex LH-20 (Esquema 2) usando mezclas de H₂O, H₂O-MeOH y MeOH, obteniendo los compuestos ácido gálico (**5**),²⁶ galato de metilo (**6**),²⁶ corilagina (**7**)⁶⁵ y geraniina (**8**).⁶⁵



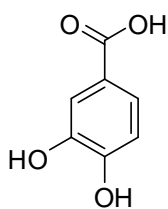
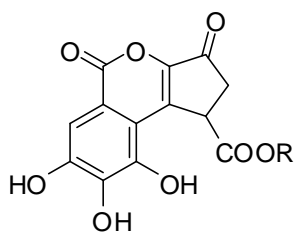
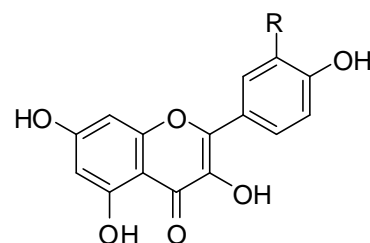
Esquema 2. Estrategia usada para la separación cromatográfica de la parte “polar” de los extractos de AcOEt, similar a la usada para los extractos MeOH.

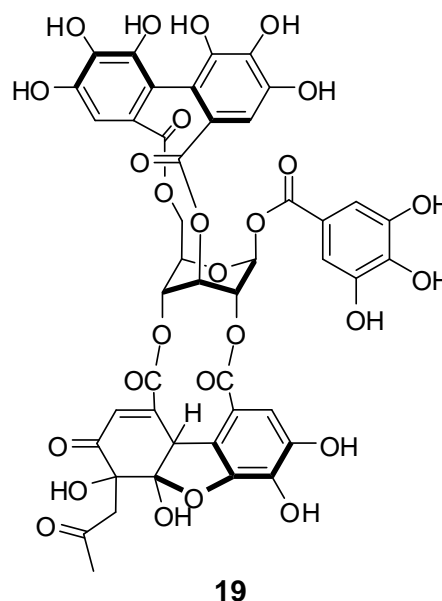
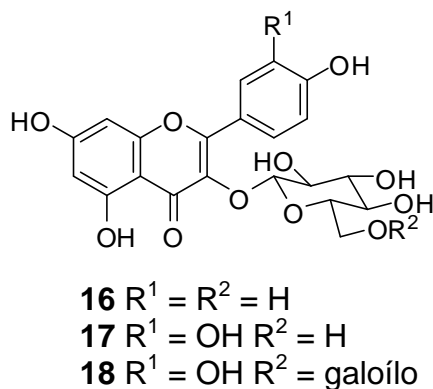


Para el caso de *G. seemanii* sólo fue posible identificar glucosa, sin embargo se tuvo evidencia de que contenía taninos debido a la coloración azul intenso generada al adicionar una solución de FeCl₃ al 1% en MeOH al extracto.

5.2. compuestos aislados de partes aéreas; extractos MeOH y acetona-agua.

La separación sistemática de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *G. bellum*, *G. potentillaefolium* y el extracto de acetona-agua (7:3) de *G. seemannii*, usando gel de sílice y/o Sephadex LH-20 y mezclas de H₂O, H₂O-MeOH y MeOH (Esquema 1) como eluyente, permitió el aislamiento de ácido gálico (**5**),²⁶ corilagina (**7**),⁶⁵ geraniina (**8**)⁶⁵ ácido protocatecuico (**9**),⁶⁶ ácido brevifolin carboxílico (**10**),⁶⁷ brevifolin carboxilato de metilo (**11**),²⁶ kaempferol (**14**),²⁶ quercetina (**15**),²⁶ 3-O-β-D-glucósido de Kaempferol (**16**),⁶⁸ 3-O-β-D-glucósido de quercetina (**17**)⁶⁹ y 3-O-β-D-(6"-O-galoil) glucósido de quercetina (**18**)⁶⁹ y acetoniil geraniina (**19**).⁷⁰

**9****10** R = H**11** R = CH₃**14** R = H**15** R = OH

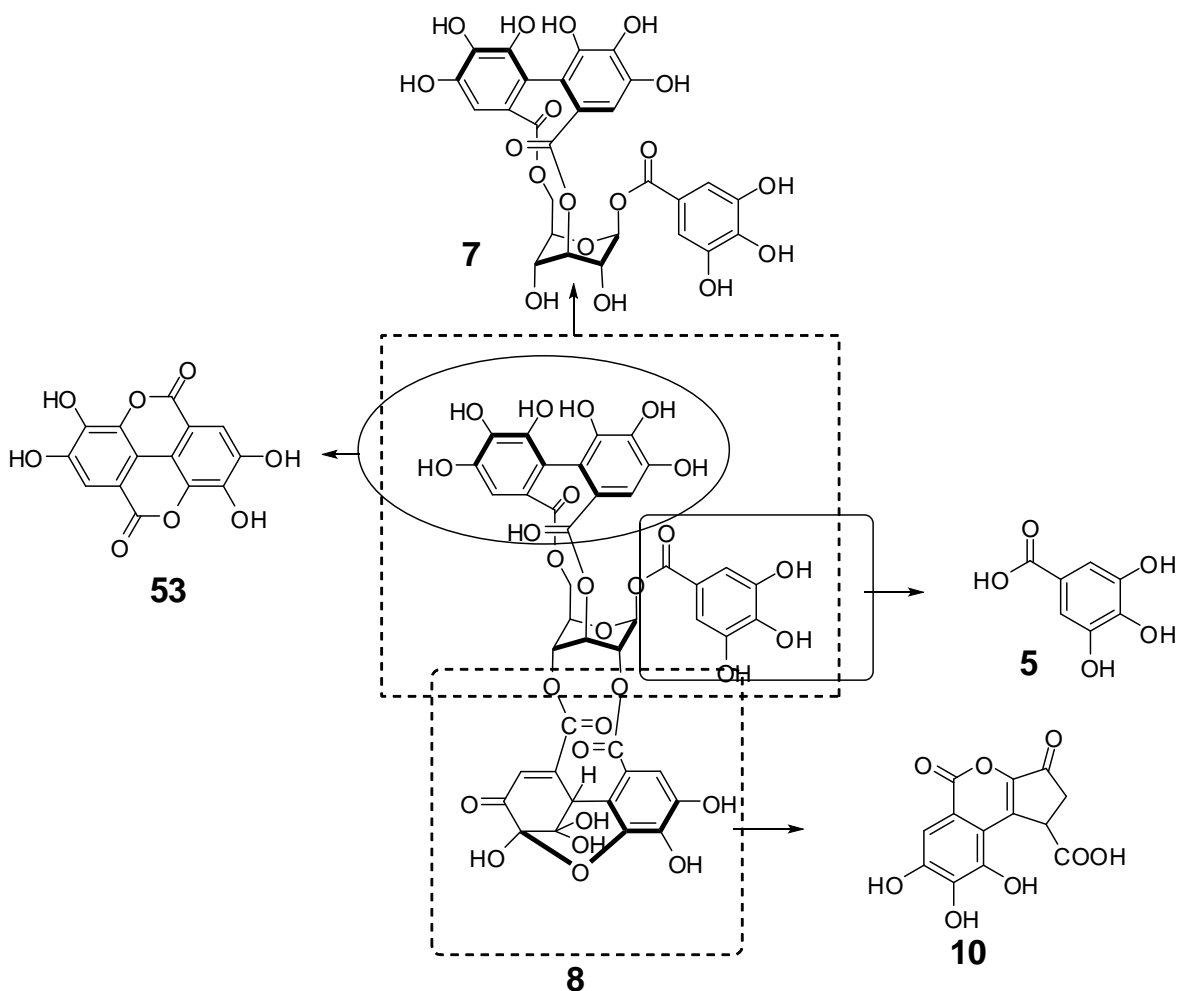


Las diferencias en la constitución química de las especies fueron mínimas y principalmente recayó en los flavonoides y ácidos fenólicos. El compuesto **14** no se encontró en *G. bellum*, y **16** no estuvo presente en *G. potentillaefolium*; **9** y **19** sólo estuvieron presentes en *G. seemannii*.

Por su parte el tanino geraniina (**8**), reportado en otras especies de geranium, se encontró como componente principal de las partes aéreas de las tres especies estudiadas. Su abundancia con respecto al peso seco del extracto fue alrededor de 10% en los extractos de MeOH, mientras que en las raíces de *G. bellum* y *G. potentillaefolium* su rendimiento fue de 14% aproximadamente.

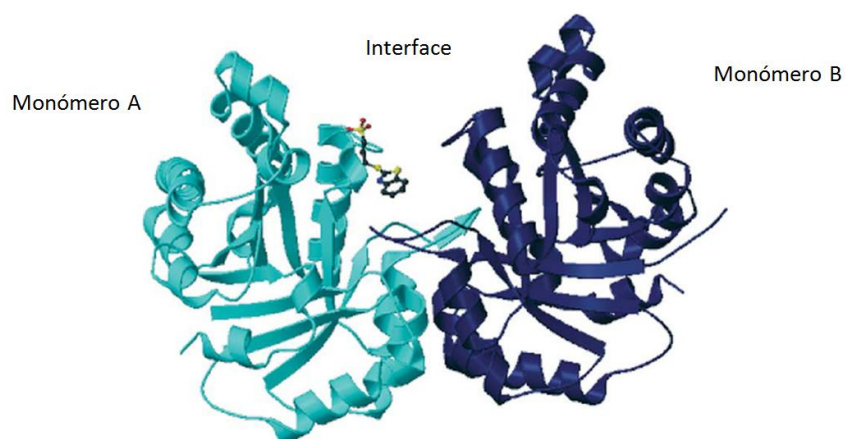
El compuesto **8** se sometió a hidrólisis ácida en H_2SO_4 al 5%, generando los compuestos ácido elágico (**53**) y ácido gálico (**5**), en 82% de rendimiento, confirmando la estructura de **8**. Es conocido⁷¹ que cuando la geraniina (**8**) se somete a hidrólisis ácida se obtienen como únicos productos de naturaleza fenólica **53** y **5**.

Debe mencionarse que probablemente la presencia de los compuestos **6**, **7**, **10** y **11** se deba a la ruptura del compuesto geraniina (**8**), y esto sucede debido a la interacción del disolvente usado en la extracción del material vegetal. Esto queda de manifiesto con los compuestos **6** y **11** debido a que solo estuvieron presentes cuando se usó MeOH como disolvente de extracción en *G. bellum*, *G. potentillaefolium* y *G. seemanni*, y no se hallaron en los extractos de AcOEt (*G. bellum* y *G. potentillaefolium*) y acetona-agua (*G. seemanni*).



5.3 Capacidad de los compuestos para inhibir TIMTc

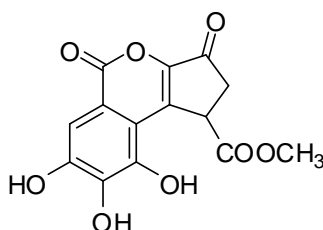
Algunos grupos han considerado a la triosa fosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TIMTc) y otros parásitos como un buen blanco para el diseño de fármacos,⁵¹ específicamente las triosa fosfato isomerasa humana (TIMH) y la de *Trypanosoma cruzi* (TIMTc) son activas como homodímeros, y cada monómero mantiene su sitio activo propio. Entre los dos monómeros existe una interface, bastante amplia (1476 Å²), dentro de la cual existen diferencias entre las dos enzimas: una de ellas es que en la parte denominada aro 3 formado por ochenta residuos peptídicos el residuo 15 es cisteína en parásitos y en humanos es una metionina, otra diferencia es que la humana está formada por ochenta y un residuos. Debido a que las TIMs solo son catalíticamente activas en su forma homodimérica, se ha establecido que la perturbación en esta interface por compuestos orgánicos genera la inactivación de la enzima.^{51, 52.}



Perturbación generada por el compuesto **92** en la TIMTc.⁵¹

Los compuestos obtenidos en este trabajo fueron enviados para su evaluación de la inhibición enzimática de la triosafosfato isomerasa de *T. cruzi*. Esta investigación fue llevada a cabo por nuestro colaborador, el Dr. Alfredo Téllez del Centro de Investigación en Alimentos y Nutrición, Facultad de Medicina, de la Universidad Juárez del Estado de Durango.

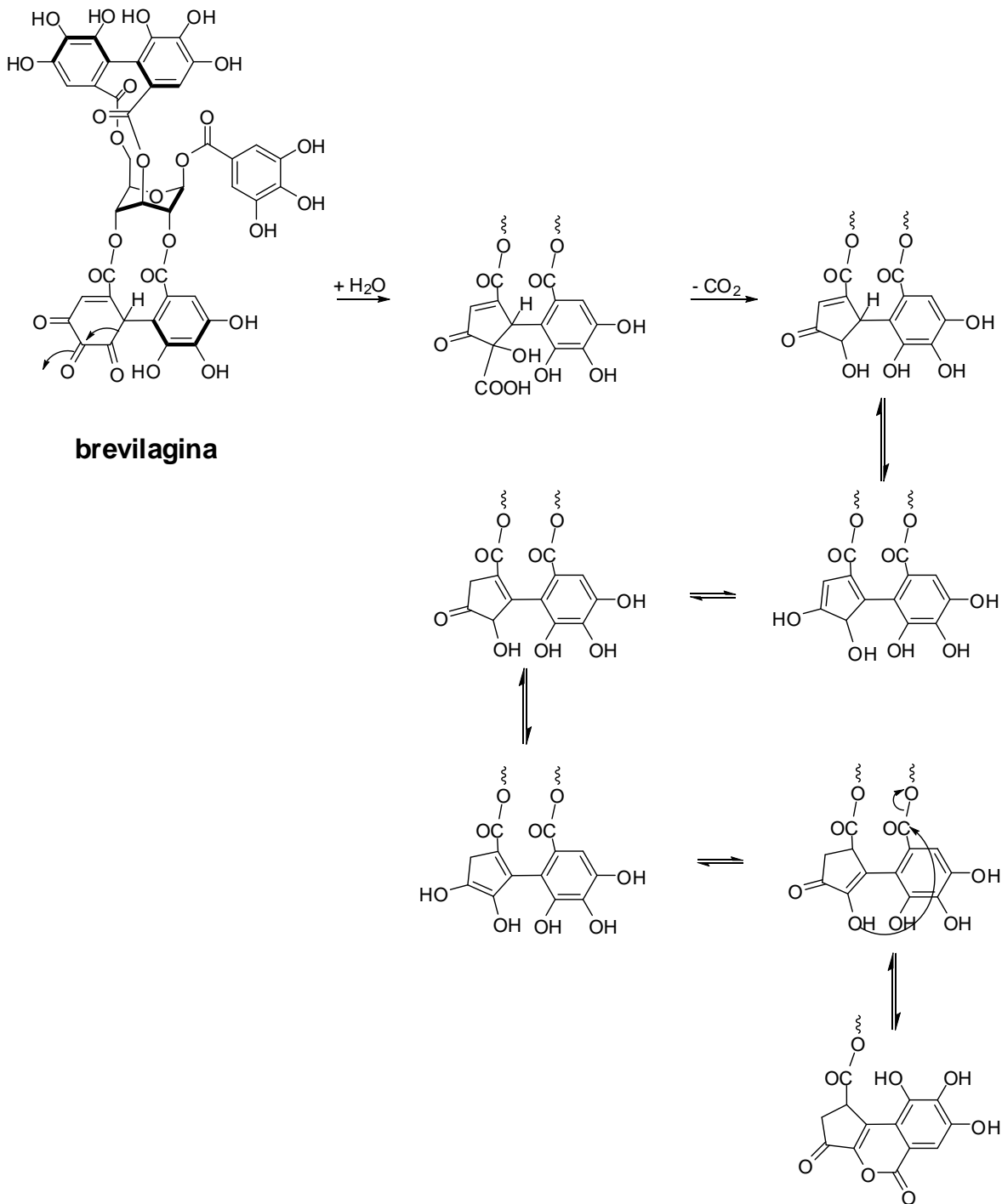
En un análisis inicial de los compuestos aislados de los extractos de AcOEt y MeOH, el compuesto más activo fue el brevifolin carboxilato de metilo **11**, el cual registró la menor IC₅₀ (7 μM). Cabe mencionar que el compuesto **11** también se evaluó con la enzima humana y aun a concentración 1 mM, no inhibe la actividad enzimática humana, por lo que su especificidad es muy alta contra la enzima del parásito.

**11**

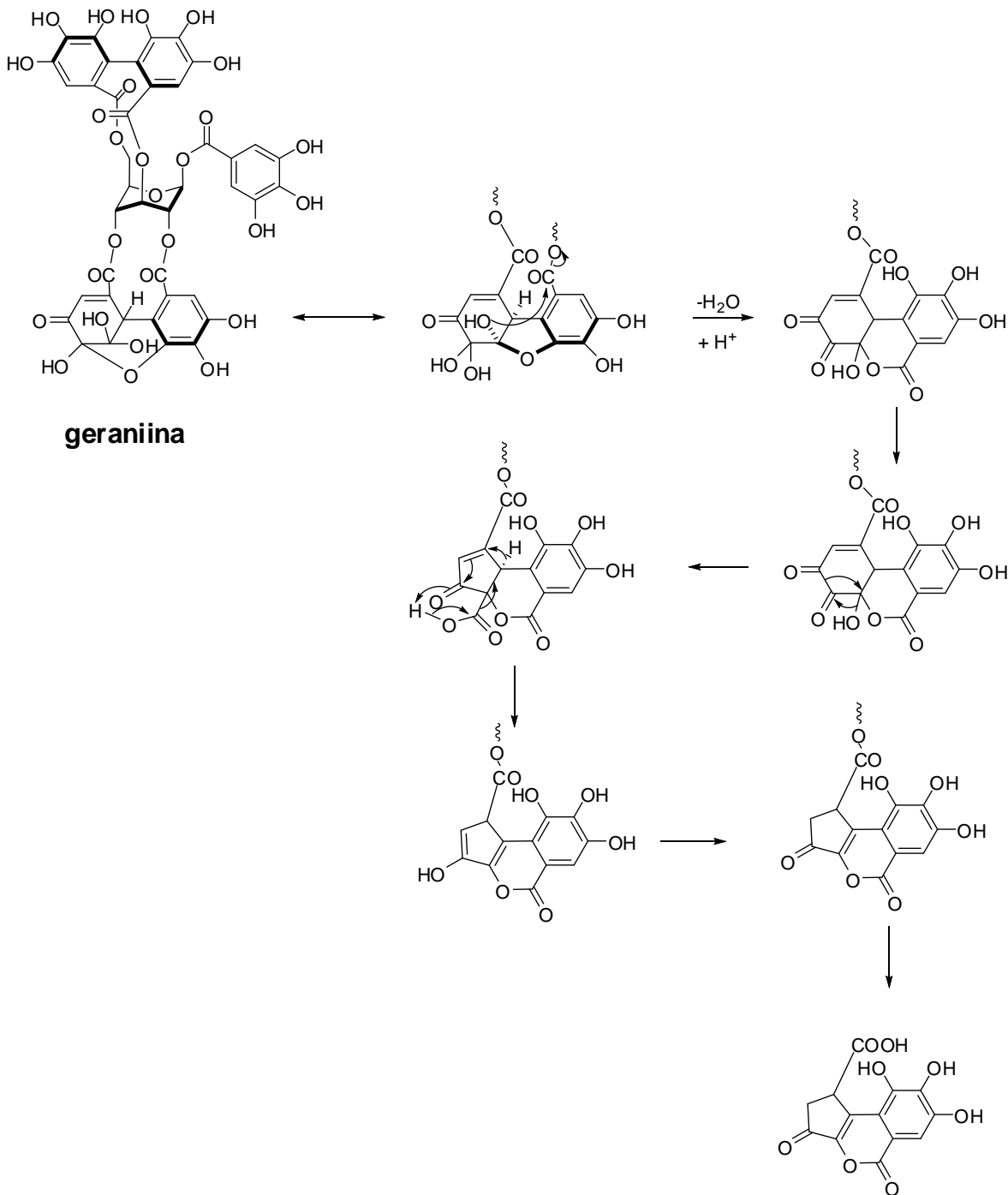
En un intento por obtener otras estructuras relacionadas con **11**, se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva⁷¹⁻⁷⁵ permitiéndonos conocer que el compuesto **11** se obtiene de la alcoholisis de taninos superiores. Esta aseveración se propuso a partir de los siguientes datos:

- 1967, Schmith O.V. y colaboradores propone que el ácido brevifolin carboxílico se obtiene a partir de la brevilagina.⁷²
- 1977, Okuda T. propone la formación del núcleo del ácido brevifolin carboxílico y brevifolina durante el proceso de extracción mediante la hidrólisis de la geraniina.⁷¹
- 1987, Guo J. S. obtiene el brevifolin carboxilato de etilo (**12**) del extracto de etanol de *Geranium sibirum*.⁷³
- 1990, Tanaka T. obtiene la formación del núcleo del ácido brevifolin carboxílico en 30% de rendimiento. Mediante una reacción en medio básico utilizando geraniina en acetonitrilo y trietilamina a 80° C en 10 min.⁷⁴
- 1993, Yao Q. Q. obtuvo brevifolin carboxilato de metilo (**11**) del extracto de metanol de *Phyllanthus urinaria*.⁷⁵

1967, propuesta de Schmidt y col. a partir de la brevilagina.

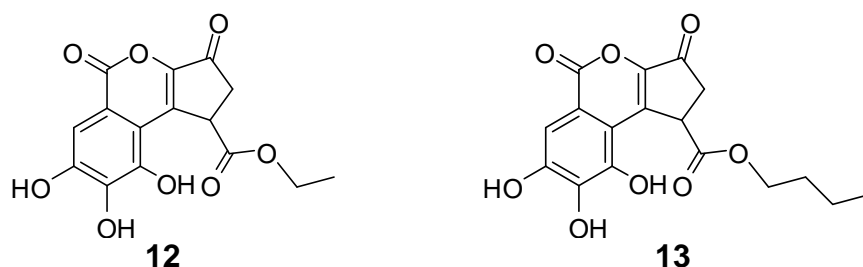


1977, Propuesta de Okuda y col. a partir de la geraniina (8).



Ya que nuestro interés consistía en obtener nuevos derivados del ácido brevifolin carboxílico se intentó obtener los ésteres de etilo (**12**) y *n*-butilo (**13**), esto fue logrado colocando el material vegetal y el alcohol correspondiente a reflujo durante 8 h. En este proceso se utilizó *G. bellum* para obtener los derivados debido a la cantidad de material vegetal que se tenía colectado, además de que la metodología de aislamiento fue muy similar a la que se describió en nuestro trabajo anterior.²⁶

De tal manera que se obtuvieron los extractos de etilo y *n*-butilo de la parte aérea de *G. bellum*, cuya separación mediante cromatografía en columna, condujo a la obtención de los ésteres **12** y **13** en rendimientos de 0.009% y 0.007%, a partir del material seco.



La concentración que registraron de los compuestos **12** y **13** para inhibir el 50% de la actividad enzimática de la TIMTc fue de 8 μ M y 12 μ M, respectivamente, por lo que estos resultados mostraron que el incremento en la longitud de la cadena hidrocarbonada del éster disminuye su potencia en la inactivación enzimática.

Tabla 5. Comparación de compuestos reportados como inhibidores contra los derivados del ácido brevifolin carboxílico.

| compuesto | IC ₅₀ TIM <i>T. cruzi</i> | IC ₅₀ TIM Humana |
|-----------|--------------------------------------|-----------------------------|
| 92 | 33.0 μ M | 422 μ M |
| 93 | 8.0 μ M | 1600 μ M |
| 94 | 0.2 μ M | 98 μ M |
| 11 | 7.0 μ M | - |
| 12 | 8.0 μ M | - |
| 13 | 12.0 μ M | - |

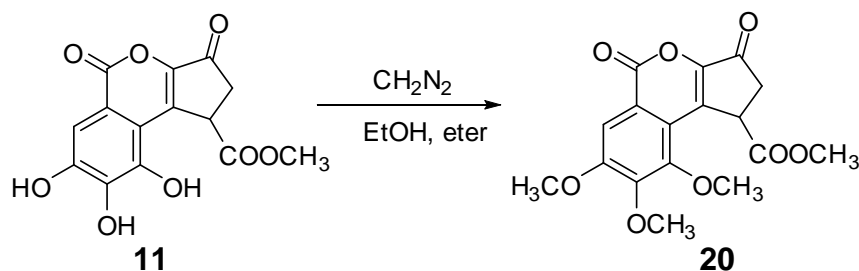
-Medido a 1mM y no causo ningún efecto en la enzima humana

En la Tabla 5 es de resaltarse el hecho de que el inhibidor reportado **94** es 35 veces más activo que los derivados del ácido brevifolin carboxílico (**11-13**). Sin

embargo, los compuestos **92-94** generan inhibición de la enzima humana, mientras que los compuestos **11-13** no inhiben la enzima TIM Humana aun a concentraciones mili-molares por lo que su selectividad es muy alta contra la enzima del parásito. A la fecha, estos compuestos son los únicos inhibidores selectivos obtenidos a partir de fuentes naturales.

En un intento por explorar la interacción de los tres grupos OH de fenol presentes en las moléculas, se decidió metilar el ester **11** ya que fue el más activo de los tres.

Para tal fin, 70 mg de **11** fueron disueltos en EtOH seco y tratado con diazometano en éter etílico durante 24 h, la mezcla obtenida fue concentrada a presión reducida y separada por cromatografía en gel de sílice, usando mezclas de *n*-hexano-AcOEt para obtener 30 mg del derivado tri-O-metil brevifolin carboxilato de metilo (**20**).



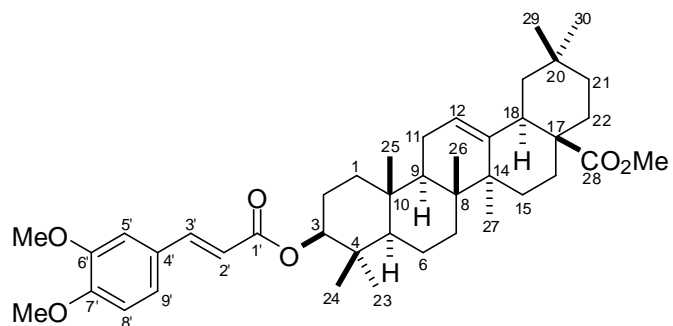
El compuesto **20** fue inactivo contra la enzima TIMTc, aún a concentraciones mil veces mayores que 7 μM de **11**. Además **20** también fue incapaz de inhibir la enzima humana a concentraciones milimolares. Con estos resultados se estableció que los fenoles son parte importante de la actividad de estos compuestos.

Estos resultados fueron publicados en el artículo científico “Selective inactivation of triose phosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by brevifolin carboxylate derivatives from *Geranium bellum*”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 5936–5939.

6. CONCLUSIONES

1. El estudio químico de las especies estudiadas condujo al aislamiento y caracterización de 20 compuestos, de los cuales el compuesto **4** no había sido descrito en el género, mientras que el compuesto **13** representa un nuevo derivado del ácido brevifolin carboxílico.
2. Las diferencias entre los compuestos aislados de las partes aéreas de las tres especies estudiadas prácticamente son mínimas; sin embargo las raíces de *G. seemannii* mostraron una química diferente con respecto a *G. bellum* y *G. potentillaefolium*.
3. El compuesto geraniina **8**, fue uno de los compuestos mayoritarios presente en partes aérea y en raíces de las tres especies estudiadas en rendimientos de 10% a 14%.
4. Los derivados **11**, **12** y **13** son los únicos inhibidores reportados capaces de inhibir la triosa fosfato isomerasa de *T. cruzi* y que no inhiben la triosa fosfato isomerasa humana.
5. Los ésteres derivados del ácido brevifolin carboxílico (**10**), fueron excelentes inhibidores selectivos de la triosa fosfato isomerasa de *T. cruzi*, con lo cual se generaron nuevas moléculas líderes para el desarrollo de futuros fármacos, para el tratamiento y control de la enfermedad de chagas.

7. EVIDENCIAS ESPECTROSCÓPICAS



7.1 3 β -O-(6',7'-dimetil)-*E*-cafeoiloleanolato de metilo (**3a**)

Sólido blanco amorfo PM = 660 g/mol, pf = 144-147°C, RMN de ^1H (Figura 1) y ^{13}C (Figura 2 y Tabla 2).

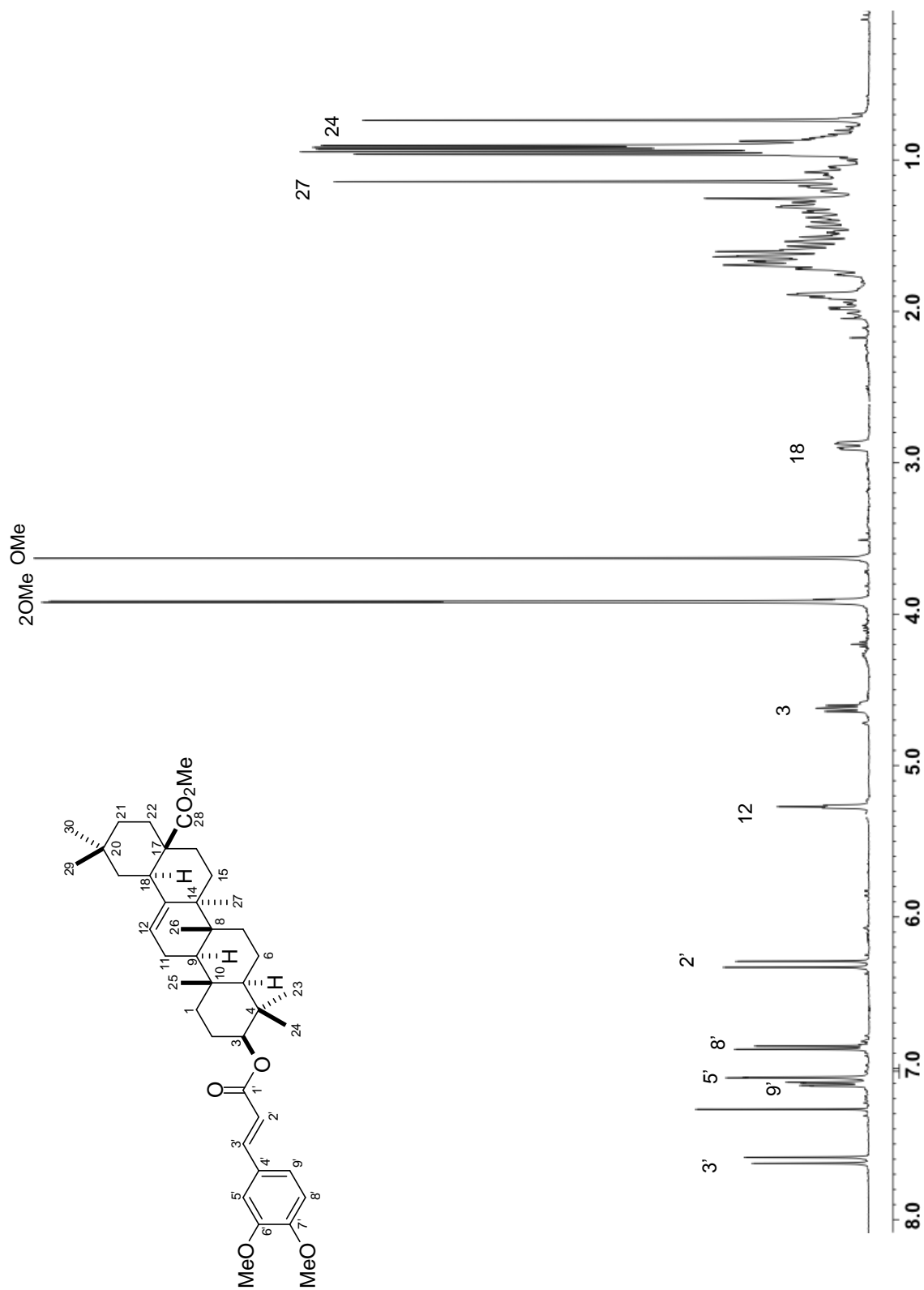


Figura 1. Espectro de RMN de ¹H de **3a** en CDCl₃ a 400 MHz.

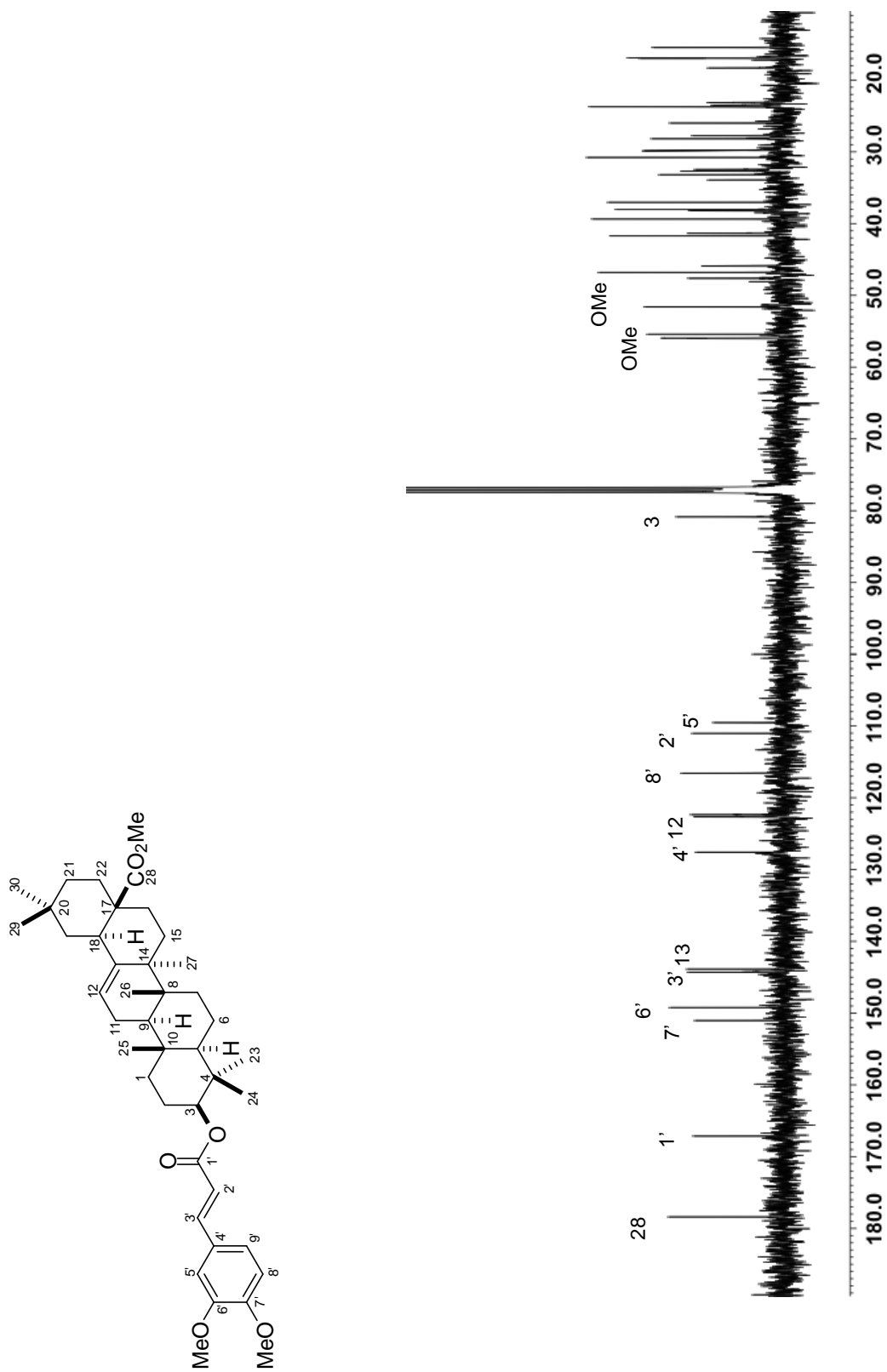


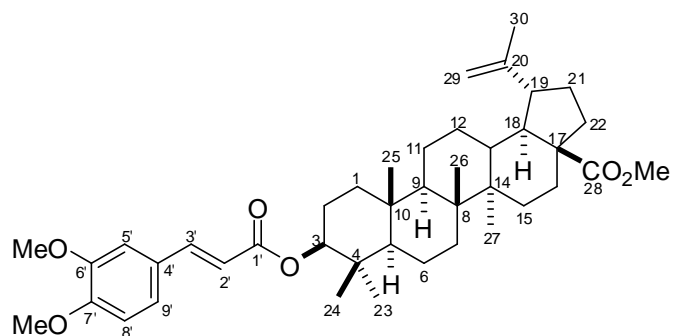
Figura 2. Espectro de RMN de ^{13}C de **3a** en CDCl_3 a 100 MHz.

Tabla 6. Datos de RMN de **3a** y Ref.⁶⁴

| ¹³ C | | | ¹³ C | | |
|-----------------|----------------------------|-------|-----------------|----------------------------|-------|
| Núm | δ en ppm CDCl ₃ | | Núm. | δ en ppm CDCl ₃ | |
| | exp | ref | | exp | ref |
| 1 | 38.0 | 38.5 | 6' | 149.2 | 146.5 |
| 2 | 25.9 | 24.4 | 7' | 151.0 | 148.9 |
| 3 | 80.8 | 80.8 | 8' | 116.6 | 116.3 |
| 4 | 38.4 | 38.8 | 9' | 122.3 | 122.2 |
| 5 | 56.0 | 56.0 | OMe | 51.6 | 51.3 |
| 6 | 18.3 | 19.0 | OMe | 55.4 | 55.5 |
| 7 | 33.2 | 33.5 | OMe | 55.9 | 55.7 |
| 8 | 39.4 | 40.1 | | | |
| 9 | 47.0 | 48.3 | | | |
| 10 | 37.0 | 37.7 | | | |
| 11 | 23.7 | 24.1 | | | |
| 12 | 122.7 | 122.7 | | | |
| 13 | 143.8 | 145.0 | | | |
| 14 | 41.7 | 42.5 | | | |
| 15 | 28.1 | 28.4 | | | |
| 16 | 23.0 | 23.7 | | | |
| 17 | 45.0 | 46.8 | | | |
| 18 | 41.3 | 42.1 | | | |
| 19 | 46.0 | 46.8 | | | |
| 20 | 30.7 | 31.3 | | | |
| 21 | 34.3 | 34.4 | | | |
| 22 | 32.4 | 33.3 | | | |
| 23 | 29.7 | 28.5 | | | |
| 24 | 16.9 | 17.3 | | | |
| 25 | 15.4 | 15.8 | | | |
| 26 | 16.9 | 17.7 | | | |
| 27 | 27.7 | 26.3 | | | |
| 28 | 178.4 | 179.3 | | | |
| 29 | 32.3 | 33.4 | | | |
| 30 | 23.4 | 23.9 | | | |
| 1' | 167.1 | 167.1 | | | |
| 2' | 111.0 | 115.8 | | | |
| 3' | 144.4 | 145.4 | | | |
| 4' | 127.6 | 127.3 | | | |
| 5' | 109.5 | 115.1 | | | |

Continuación **Tabla 5.** Datos de RMN de **3a** y Ref.⁶⁴

| ¹ H | | en ppm CDCl ₃ (<i>Mult.</i> ; <i>J</i> en Hz) | |
|----------------|----------------------------|---|--|
| Núm. | exp | Ref | |
| 3' | 7.62 (<i>d</i> ; 15.7) | 7.62 (<i>d</i> ; 15.7) | |
| 9' | 7.10 (<i>dd</i> ; 8, 1.5) | 7.10 (<i>dd</i> ; 8, 1.5) | |
| 5' | 7.06 (<i>d</i> ; 1.5) | 7.06 (<i>d</i> ; 1.5) | |
| 8' | 6.86 (<i>d</i> ; 8) | 6.86 (<i>d</i> ; 8) | |
| 2' | 6.31 (<i>d</i> ; 15.7) | 6.31 (<i>d</i> ; 15.7) | |
| 12 | 5.29 (<i>t</i> ; 3.3) | 5.29 (<i>t</i> ; 3.3) | |
| 3 | 4.64 (<i>d</i> ; 8) | 4.64 (<i>d</i> ; 8) | |
| 27 | 1.14 (<i>s</i>) | 1.14 (<i>s</i>) | |
| 25 | 0.96 (<i>s</i>) | 0.96 (<i>s</i>) | |
| 26 | 0.94 (<i>s</i>) | 0.94 (<i>s</i>) | |
| 30 | 0.93 (<i>s</i>) | 0.93 (<i>s</i>) | |
| 29 | 0.92 (<i>s</i>) | 0.92 (<i>s</i>) | |
| 23 | 0.90 (<i>s</i>) | 0.90 (<i>s</i>) | |
| 24 | 0.74 (<i>s</i>) | 0.74 (<i>s</i>) | |
| OMe | 3.63 (<i>s</i>) | 3.63 (<i>s</i>) | |
| OMe | 3.95 (<i>s</i>) | 3.95 (<i>s</i>) | |
| OMe | 3.96 (<i>s</i>) | 3.96 (<i>s</i>) | |



7.2 3-O- β -(6',7'-dimetil)-*E*-cafeoilbetulonato de metilo (4a)

Polvo blanco PM = 660 g/mol, pf = 151-153°C, RMN de ^1H (Figura 3) y ^{13}C (Figura 4 y Tabla 3).

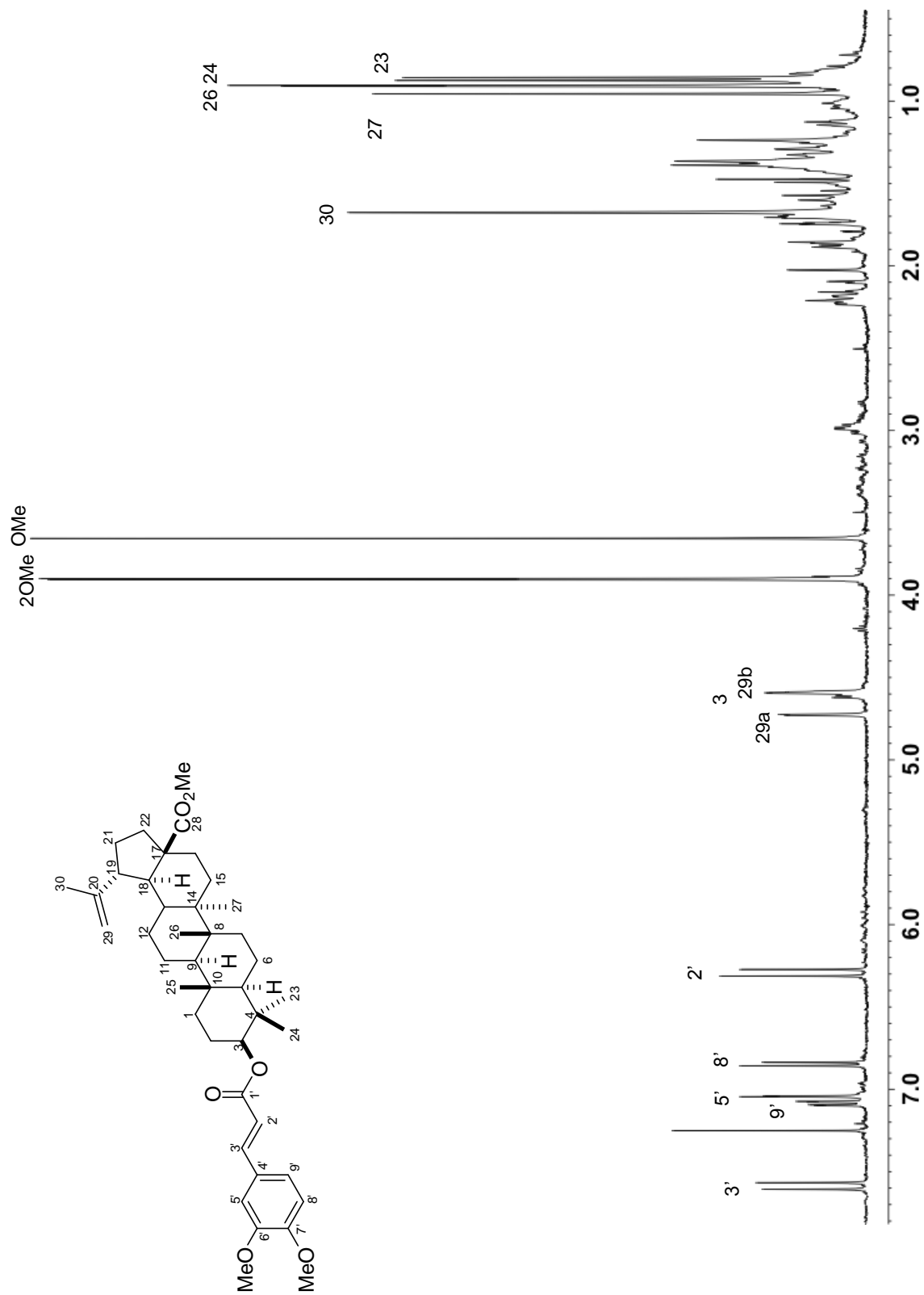


Figura 3. Espectro de RMN de ^1H de **4a** en CDCl_3 a 400 MHz.

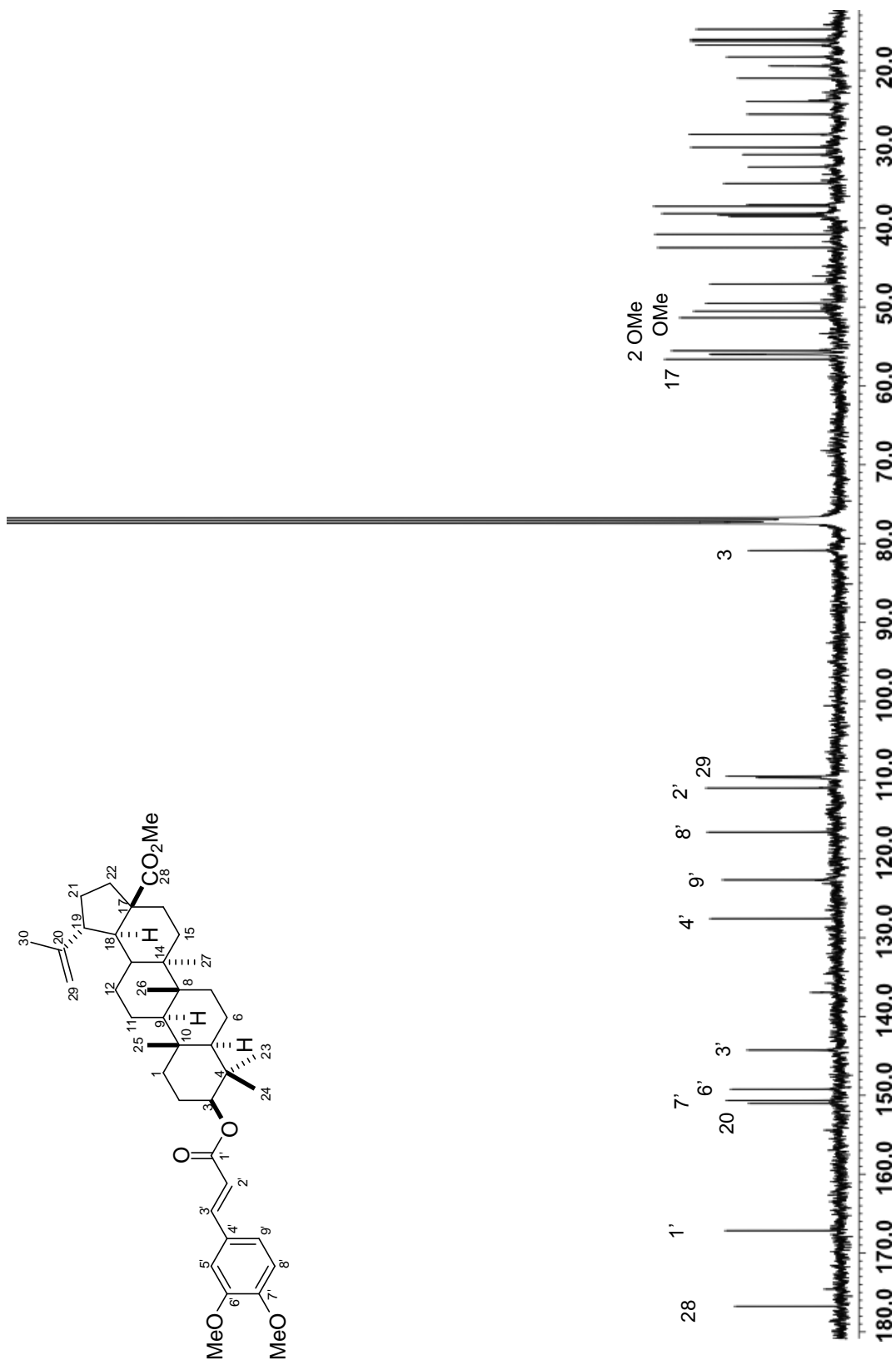


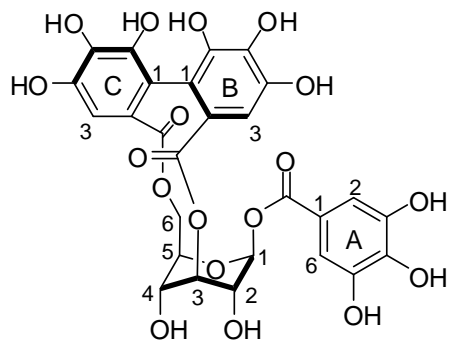
Figura 4. Espectro de RMN de ^{13}C de 4a en CDCl_3 a 100 MHz.

Tabla 7. Datos de RMN de **4a** y Ref.⁶⁴

| ¹³ C | | | ¹³ C | | |
|-----------------|----------------------------|-------|-----------------|----------------------------|-------|
| Núm | δ en ppm CDCl ₃ | | Num | δ en ppm CDCl ₃ | |
| | exp | ref | | exp | ref |
| 1 | 38.5 | 39.2 | 6' | 149.2 | 146.6 |
| 2 | 23.92 | 24.6 | 7' | 150.6 | 149.2 |
| 3 | 80.9 | 80.9 | 8' | 116.6 | 116.4 |
| 4 | 38.1 | 38.7 | 9' | 122.6 | 122.3 |
| 5 | 56.0 | 56.2 | OMe | 51.3 | 51.3 |
| 6 | 18.3 | 19.0 | OMe | 55.6 | 55.6 |
| 7 | 34.3 | 35.1 | OMe | 55.9 | 55.9 |
| 8 | 40.7 | 41.6 | | | |
| 9 | 50.52 | 51.3 | | | |
| 10 | 37.0 | 37.6 | | | |
| 11 | 20.9 | 21.8 | | | |
| 12 | 25.5 | 26.4 | | | |
| 13 | 38.3 | 39.0 | | | |
| 14 | 42.4 | 43.0 | | | |
| 15 | 29.7 | 30.5 | | | |
| 16 | 32.3 | 32.9 | | | |
| 17 | 56.6 | 56.8 | | | |
| 18 | 49.5 | 50.0 | | | |
| 19 | 47.0 | 48.0 | | | |
| 20 | 151.0 | 151.6 | | | |
| 21 | 30.66 | 31.4 | | | |
| 22 | 37.21 | 37.9 | | | |
| 23 | 28.08 | 28.4 | | | |
| 24 | 16.03 | 16.6 | | | |
| 25 | 16.8 | 17.1 | | | |
| 26 | 16.3 | 16.6 | | | |
| 27 | 14.8 | 15.1 | | | |
| 28 | 176.7 | 177.8 | | | |
| 29 | 109.5 | 109.9 | | | |
| 30 | 19.5 | 19.5 | | | |
| 1' | 167.2 | 167.2 | | | |
| 2' | 111.1 | 115.9 | | | |
| 3' | 144.3 | 145.4 | | | |
| 4' | 127.6 | 127.4 | | | |
| 5' | 109.7 | 115.2 | | | |

Continuación **Tabla 6.** Datos de RMN de **4a** y Ref.⁶⁴

| ¹ H | | en ppm CDCl ₃ (<i>Mult.</i> ; <i>J</i> en Hz) | |
|----------------|------------------------------|---|--|
| Núm | exp | ref | |
| 3' | 7.58 (<i>d</i> ; 16) | 7.58 (<i>d</i> ; 16) | |
| 9' | 7.08 (<i>dd</i> ; 8.4, 1.8) | 7.08 (<i>dd</i> ; 8.4, 1.8) | |
| 5' | 7.04 (<i>d</i> ; 1.8) | 7.04 (<i>d</i> ; 1.8) | |
| 8' | 6.84 (<i>d</i> ; 8.4) | 6.84 (<i>d</i> ; 8.4) | |
| 2' | 6.30 (<i>d</i> ; 16) | 6.30 (<i>d</i> ; 16) | |
| 29a | 4.72 (<i>d</i> ; 2.2) | 4.72 (<i>d</i> ; 2.2) | |
| 29b | 4.61 (<i>d</i> ; 2.2) | 4.61 (<i>d</i> ; 2.2) | |
| 30 | 1.67 (<i>s</i>) | 1.67 (<i>s</i>) | |
| 27 | 0.95 (<i>s</i>) | 0.95 (<i>s</i>) | |
| 26 | 0.91 (<i>s</i>) | 0.91 (<i>s</i>) | |
| 24 | 0.90 (<i>s</i>) | 0.90 (<i>s</i>) | |
| 25 | 0.87 (<i>s</i>) | 0.87 (<i>s</i>) | |
| 23 | 0.85 (<i>s</i>) | 0.85 (<i>s</i>) | |
| OMe | 3.65 (<i>s</i>) | 3.65 (<i>s</i>) | |
| OMe | 3.91 (<i>s</i>) | 3.91 (<i>s</i>) | |
| OMe | 3.92 (<i>s</i>) | 3.92 (<i>s</i>) | |



7.3 Corilagina (7)

Sólido amarillo, cristalizó como agujas en MeOH y en DMSO como hojuelas, PM = 634, punto de fusión 135-137°C, sus espectros de RMN de ^1H (Figura 5) y ^{13}C (Figura 6, Tabla 4).

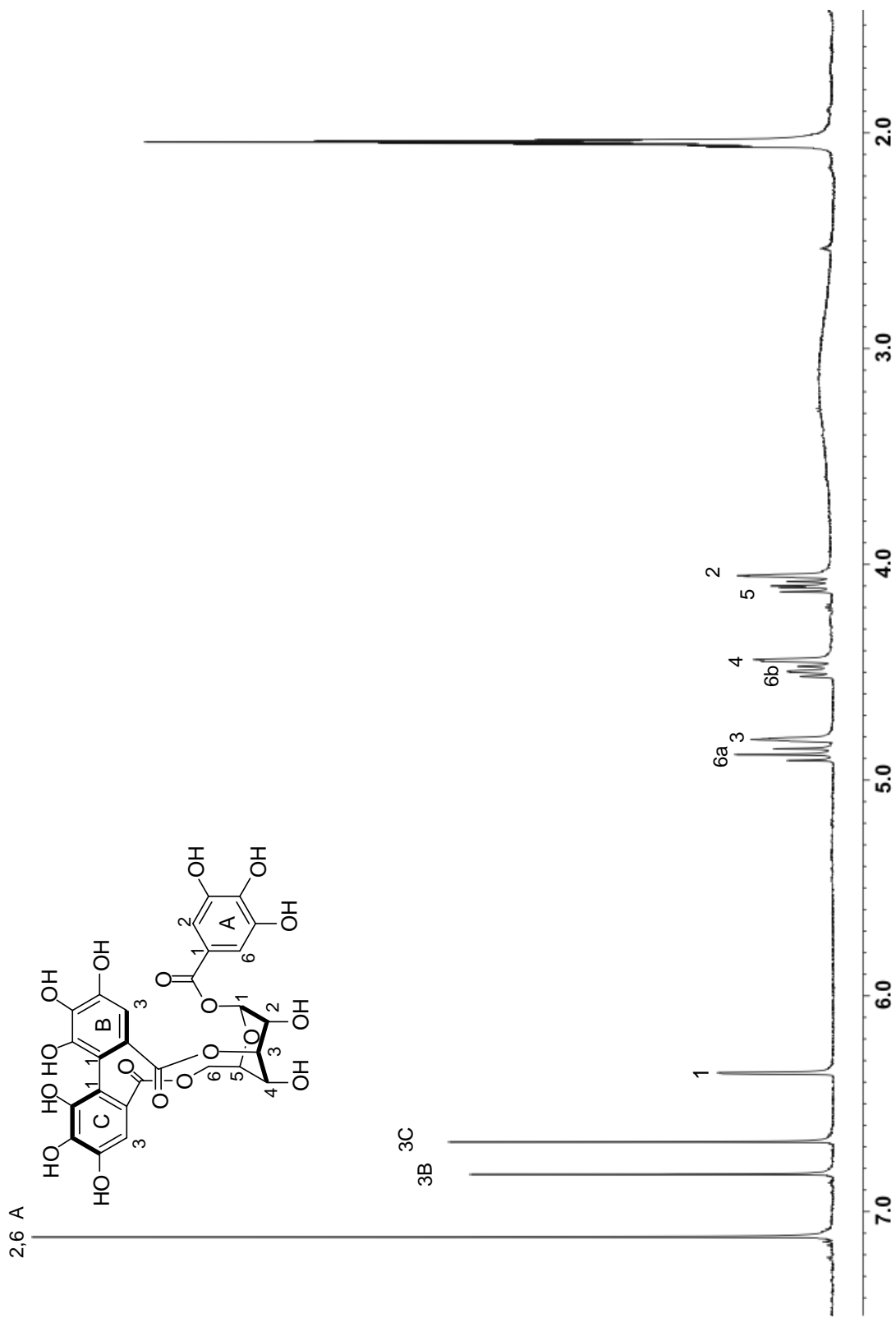


Figura 5. Espectro de RMN de ^1H de 7 en acetona- d_6 a 400 MHz.

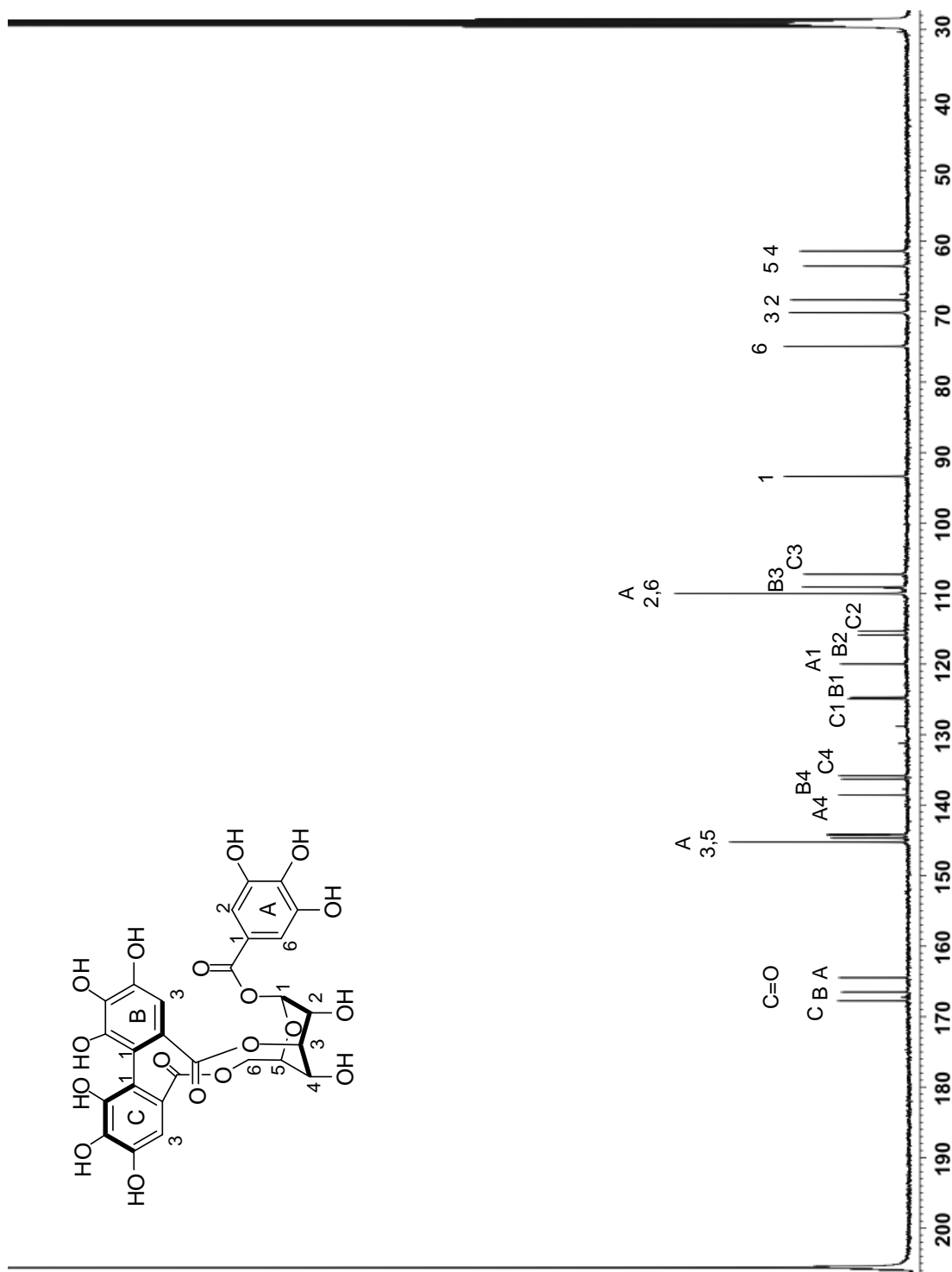
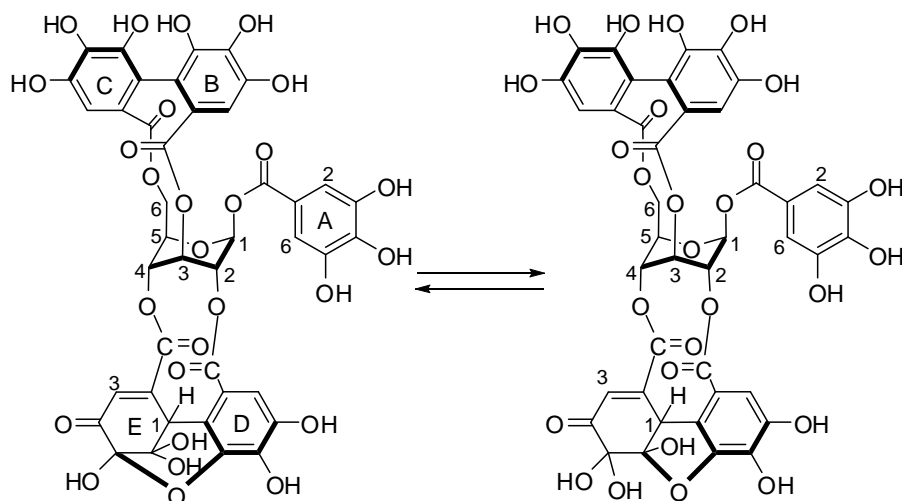


Figura 6. Espectro de RMN de ¹³C de 7 en acetona-d₆ a 100 MHz.

Tabla 8. Datos de RMN de **7** y Ref.⁶⁵

| ¹³ C | | | ¹ H | | |
|---------------------------------|-------|-------|--|------------------|------------------|
| δ en ppm acetona-d ₆ | | | en ppm acetona-d ₆ (Mult.; J en Hz) | | |
| Núm | exp | ref | Núm | exp | Ref |
| 1 | 93.4 | 94.0 | A2 | 7.12 (s) | 7.12 (s) |
| 2 | 68.4 | 68.3 | A6 | 7.12 (s) | 7.12 (s) |
| 3 | 70.2 | 70.2 | B3 | 6.82 (s) | 6.82 (s) |
| 4 | 61.4 | 61.7 | C3 | 6.67 (s) | 6.67 (s) |
| 5 | 74.9 | 74.9 | 1 | 6.35 (bs) | 6.35 (bs) |
| 6 | 63.6 | 64.8 | 6a | 4.88 (t; 11) | 4.88 (t; 11) |
| A CO | 164.5 | 164.5 | 3 | 4.81 (bs) | 4.81 (bs) |
| A1 | 120.0 | 119.8 | 6b | 4.49 (t; 9.1) | 4.49 (t; 9.1) |
| A2,6 | 110.0 | 110.3 | 4 | 4.44 (bs) | 4.44 (bs) |
| A3,5 | 145.2 | 145.8 | 5 | 4.10 (dd; 11, 9) | 4.10 (dd; 11, 9) |
| A4 | 138.6 | 140.2 | 2 | 4.02 (bs) | 4.02 (bs) |
| B CO | 166.5 | 166.5 | | | |
| B1 | 124.7 | 124.6 | | | |
| B2 | 115.3 | 115.3 | | | |
| B3 | 109.1 | 109.8 | | | |
| B4 | 136.3 | 136.8 | | | |
| B5 | 144.7 | 145.3 | | | |
| B6 | 144.3 | 144.9 | | | |
| C CO | 167.8 | 167.8 | | | |
| C1 | 124.9 | 124.9 | | | |
| C2 | 115.9 | 116.3 | | | |
| C3 | 107.3 | 107.5 | | | |
| C4 | 135.8 | 136.1 | | | |
| C5 | 144.2 | 144.8 | | | |
| C6 | 144.2 | 144.3 | | | |



7.4 Geraniina (8)

El compuesto **8** se recrystalizó en H₂O-acetona (9:1), una vez removido el disolvente se formaron unas hojuelas de color café. Es conocido que este compuesto genera un equilibrio en solución acuosa pasando de un heterociclo de 6 miembros a uno de 5 miembros entre los anillos E y D. Este equilibrio se puede observar por RMN de ¹H, en el espectro determinado a las 0 Hrs (Fig. 7) se apreció en 7.17 ppm una señal simple del protón aromático del anillo D, en 7.15 ppm una señal simple correspondiente a los protones aromáticos del anillo A, así mismo las señales simples en 7.07 ppm y 6.63 ppm correspondieron a los protones de los anillos B y C, la señal simple ancha del protón anomérico de la glucosa se apreció en 6.55 ppm, mientras que en 6.48 ppm y 5.14 ppm se observaron señales simples correspondientes con los protones de las posiciones E3 y E1. Después de 24 h (Fig. 8) se volvió a obtener el espectro de ¹H, en el cual se apreció como la señal en 7.17 ppm decreció mientras que la de 7.21 ppm se incrementó en intensidad, ellas corresponden a los protones de los anillos D y D'. Situación similar se apreció en 7.15 ppm y 7.13 ppm correspondiente con A y A', en 7.07 ppm y 7.02 ppm correspondieron con B y B', en 6.63 ppm y 6.61 ppm correspondieron con C y C', mientras que los protones de las posiciones E1' y E3' se apreciaron como señales dobles ($J = 1.6$ Hz) en 4.8 ppm y 6.2 ppm, simétricamente incrementadas con respecto al decremento de sus contrapartes en 6.48 ppm y 5.14 ppm de las posiciones E3 y E1.

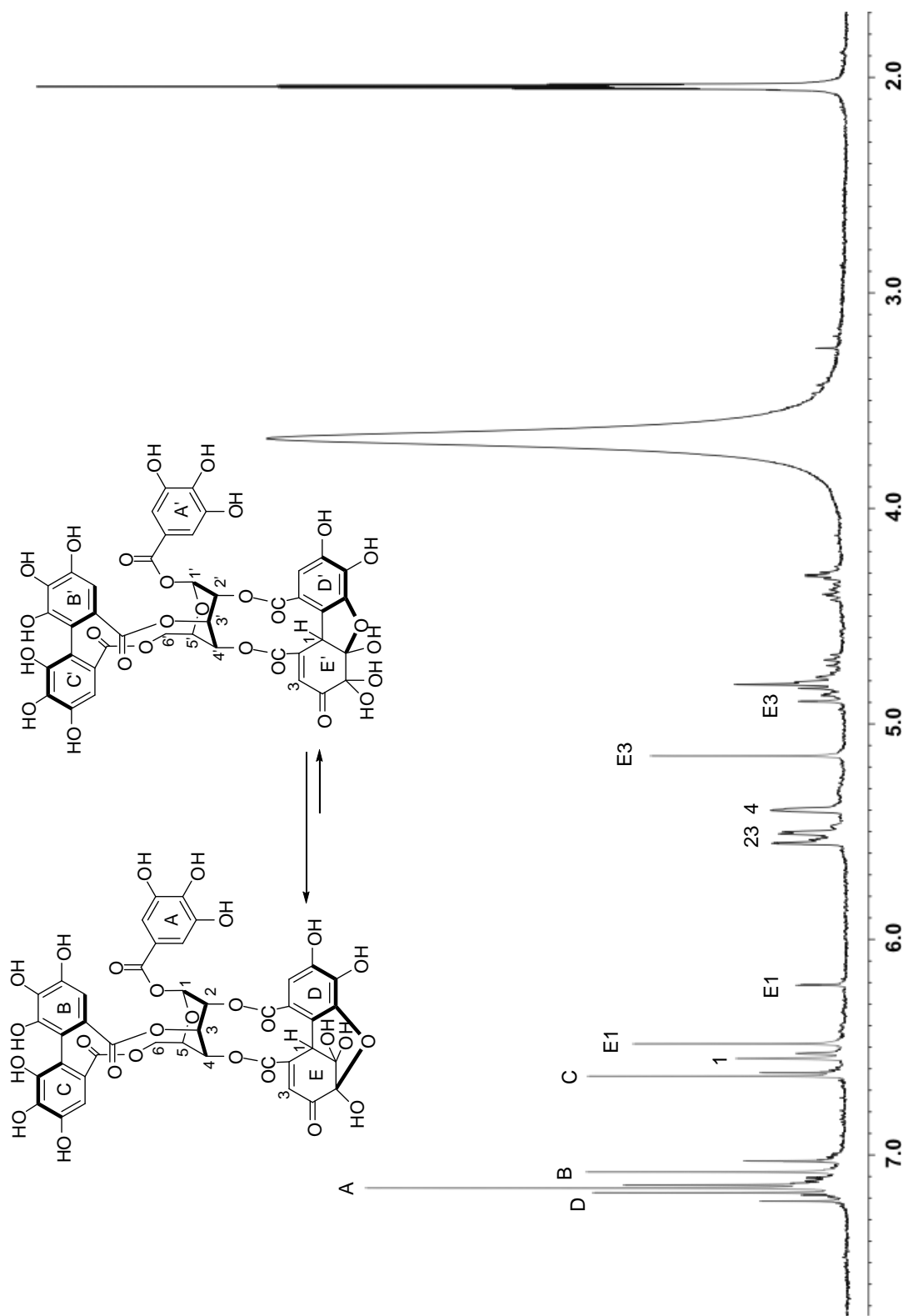


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H a 0 hrs. de **8** en acetona- d_6 : D_2O (9:1) a 400 MHz.

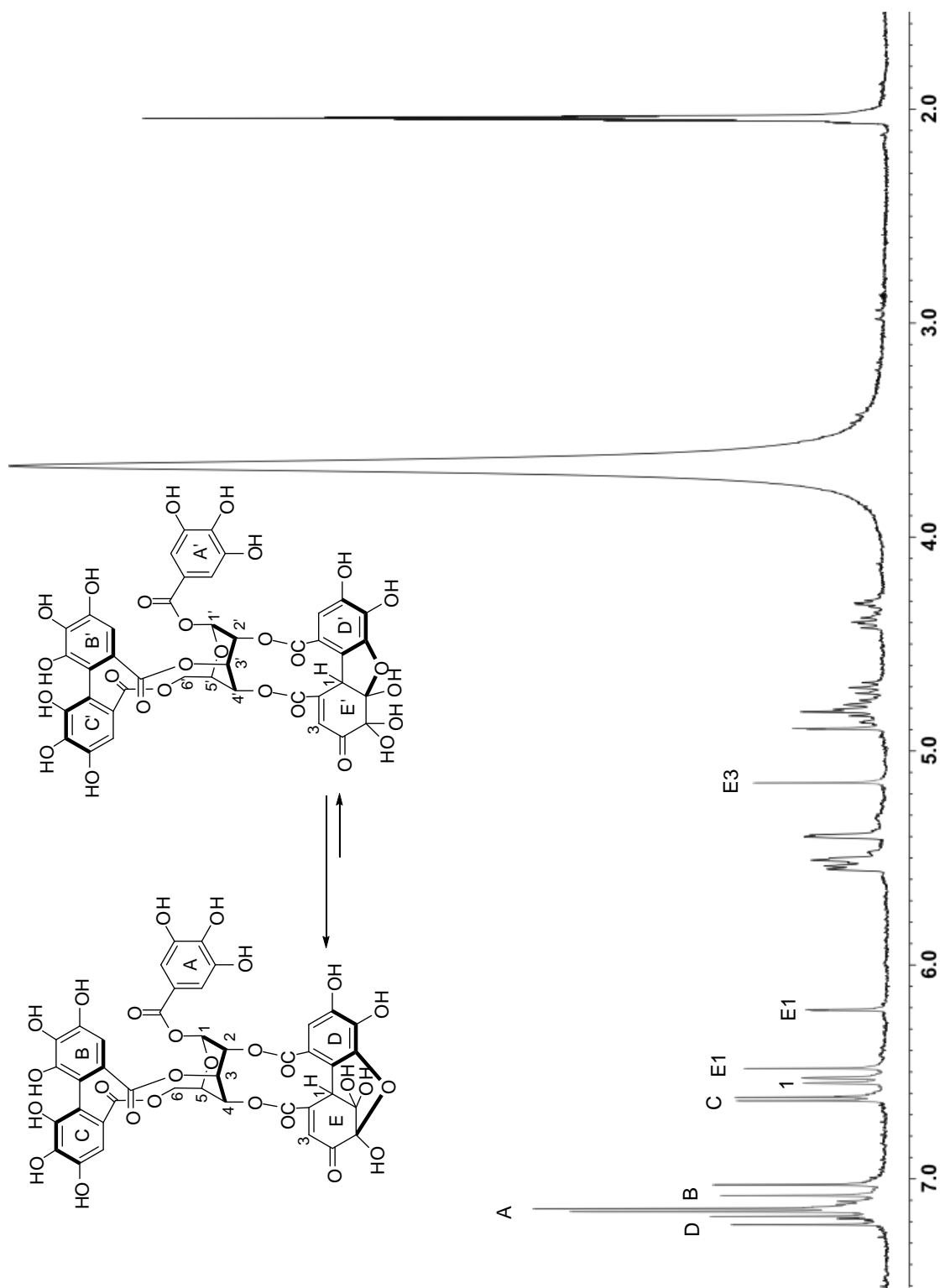
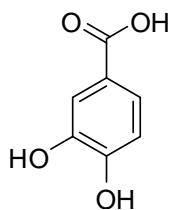


Figura 8. Espectro de RMN de ^1H a 24 hrs de **8** en acetona- d_6 : D_2O (9:1) a 400 MHz.



7.5 Ácido protocatecuico (9)

Se aisló como un sólido café amorfo PM = 154 g/mol, pf = 195°C (decomp) datos de RMN de ^1H (Figura 9), ^{13}C (Figura 10, Tabla 5).

Tabla 9. Datos RMN de **9** y Ref.⁶⁶

| ^{13}C | | | ^1H | | |
|-----------------------------|-------|-------|-------------------------------------|-------------|-------------|
| δ en ppm DMSO- d_6 | | | en ppm DMSO- d_6 (Mult.; J en Hz) | | |
| Núm | exp | Ref | Núm | exp | Ref |
| 1 | 121.6 | 121.7 | 2 | 7.38 (s) | 7.38 (s) |
| 2 | 116.6 | 116.6 | 6 | 7.27 (d; 8) | 7.27 (d; 8) |
| 3 | 148.7 | 148.8 | 5 | 6.67 (d; 8) | 6.67 (d; 8) |
| 4 | 150.1 | 150.0 | | | |
| 5 | 115.2 | 115.3 | | | |
| 6 | 122.4 | 122.2 | | | |
| 7 | 167.5 | 167.6 | | | |

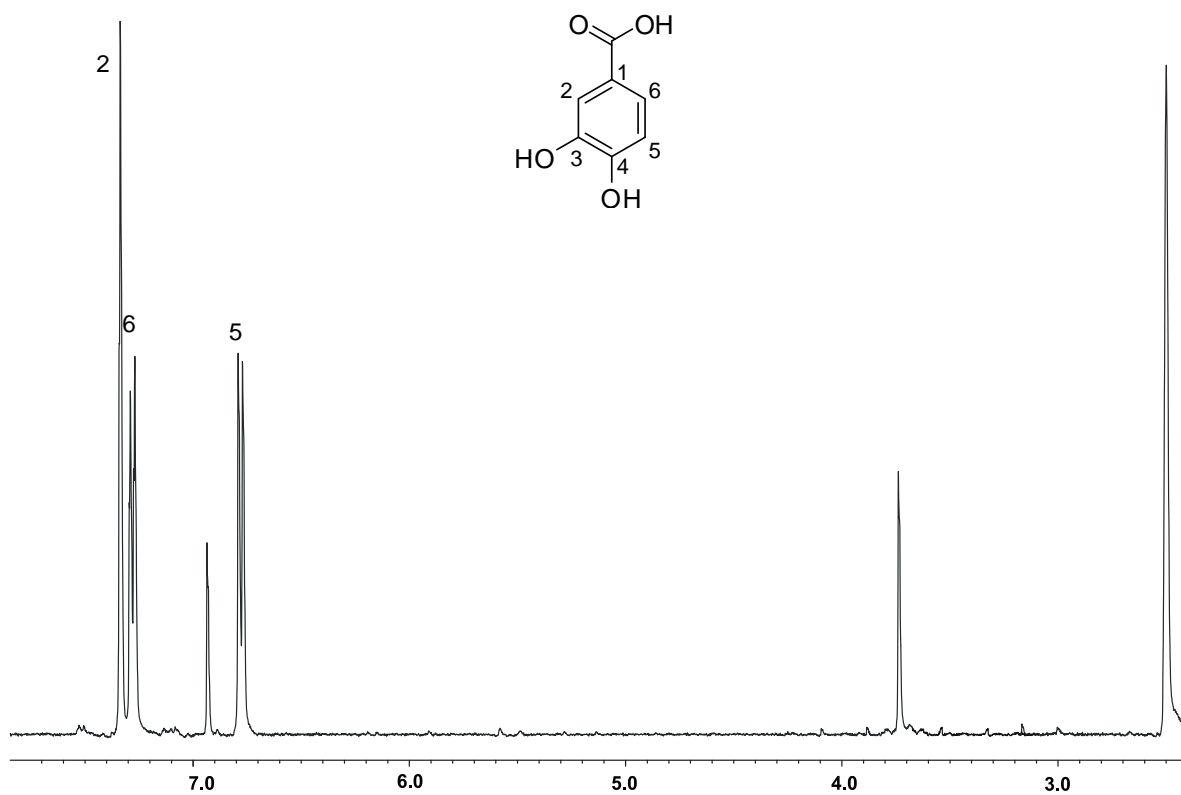


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H de **9** en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.

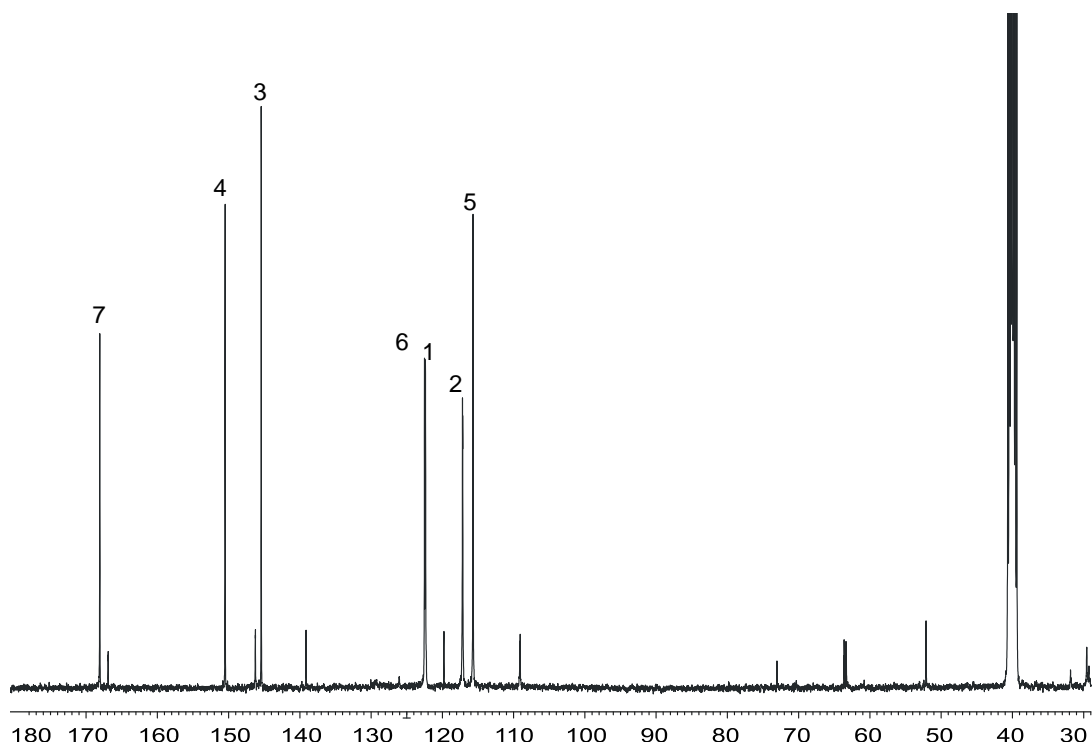
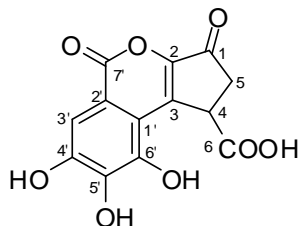


Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C de **9** en $\text{DMSO-}d_6$ a 100 MHz.



7.6 Ácido brevifolin carboxílico (10)

Se aisló como un polvo amarillo amorfo, PM = 292 g/mol, pf mayor a 280 °C (descomp) cuyos espectros de RMN de ^1H en acetona- d_6 (Figura 11) y ^{13}C (Figura 12).

Tabla 10. Datos de RMN de **10** y Ref.⁶⁷

| ^{13}C Núm | δ en ppm acetona- d_6 | | ^1H Núm. | en ppm acetona- d_6 (Mult.; J en Hz) | |
|------------------------|--------------------------------|-------|----------------------|--|----------------------|
| | exp | Ref | | exp | Ref |
| 5 | 37.5 | 37.5 | 3' | 7.42 (s) | 7.42 (s) |
| 4 | 40.8 | 41.0 | 4 | 4.56 (dd; 8, 1.8) | 4.56 (dd; 8, 1.8) |
| 3' | 108.5 | 108.3 | 5a | 3.00 (dd; 18.7, 8) | 3.00 (dd; 18.7, 8) |
| 1' | 114.0 | 113.1 | 5b | 2.54 (dd; 18.7, 1.8) | 2.54 (dd; 18.7, 1.8) |
| 2' | 115.8 | 115.2 | | | |
| 5' | 138.1 | 139.1 | | | |
| 4' | 139.6 | 140.2 | | | |
| 6' | 143.3 | 143.9 | | | |
| 3 | 146.9 | 145.7 | | | |
| 2 | 148.8 | 149.6 | | | |
| 7' | 160.3 | 160.3 | | | |
| 6 | 173.2 | 173.6 | | | |
| 1 | 192.9 | 193.4 | | | |

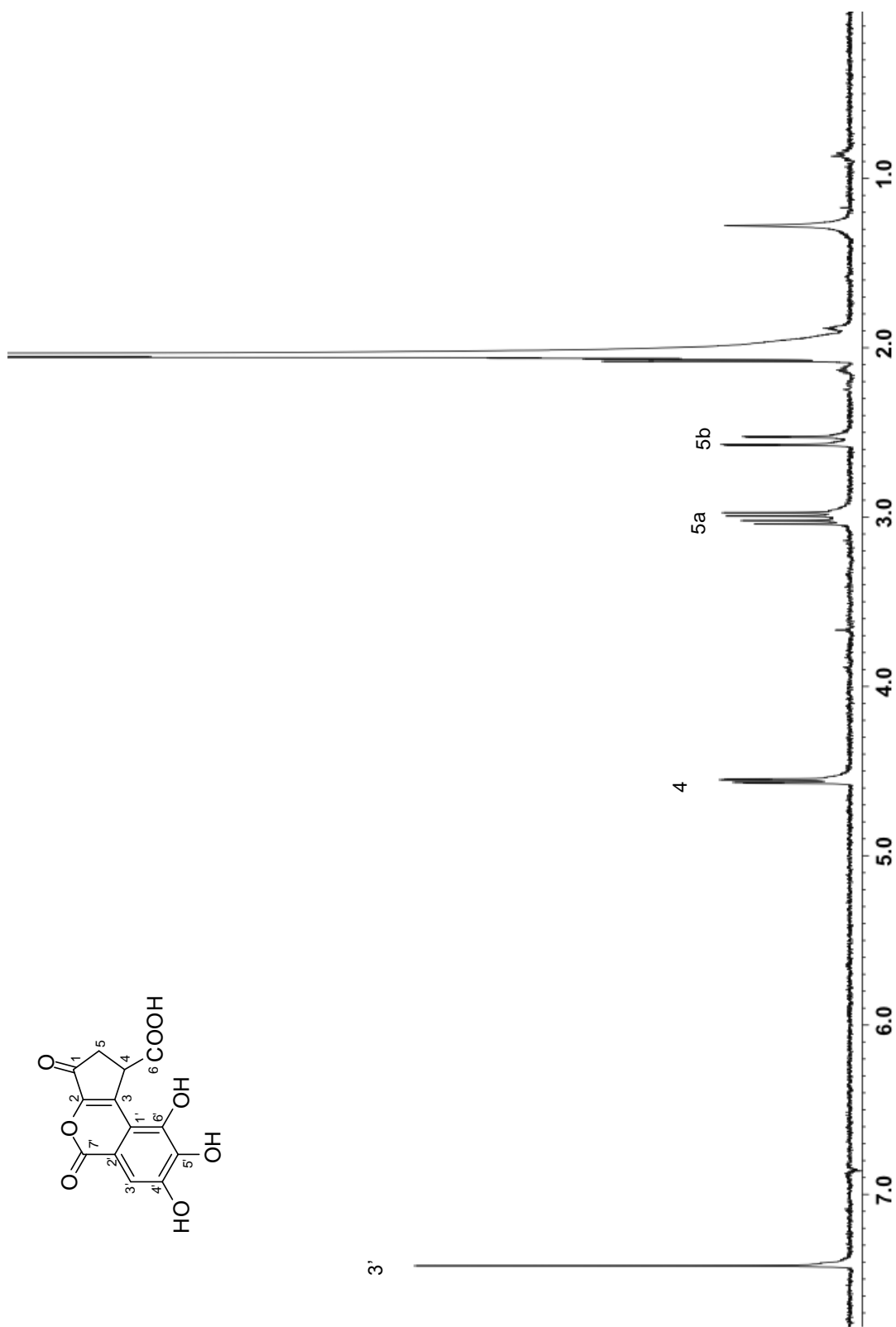


Figura 11. Espectro de RMN de ^1H de **10** en acetona- d_6 a 400 MHz.

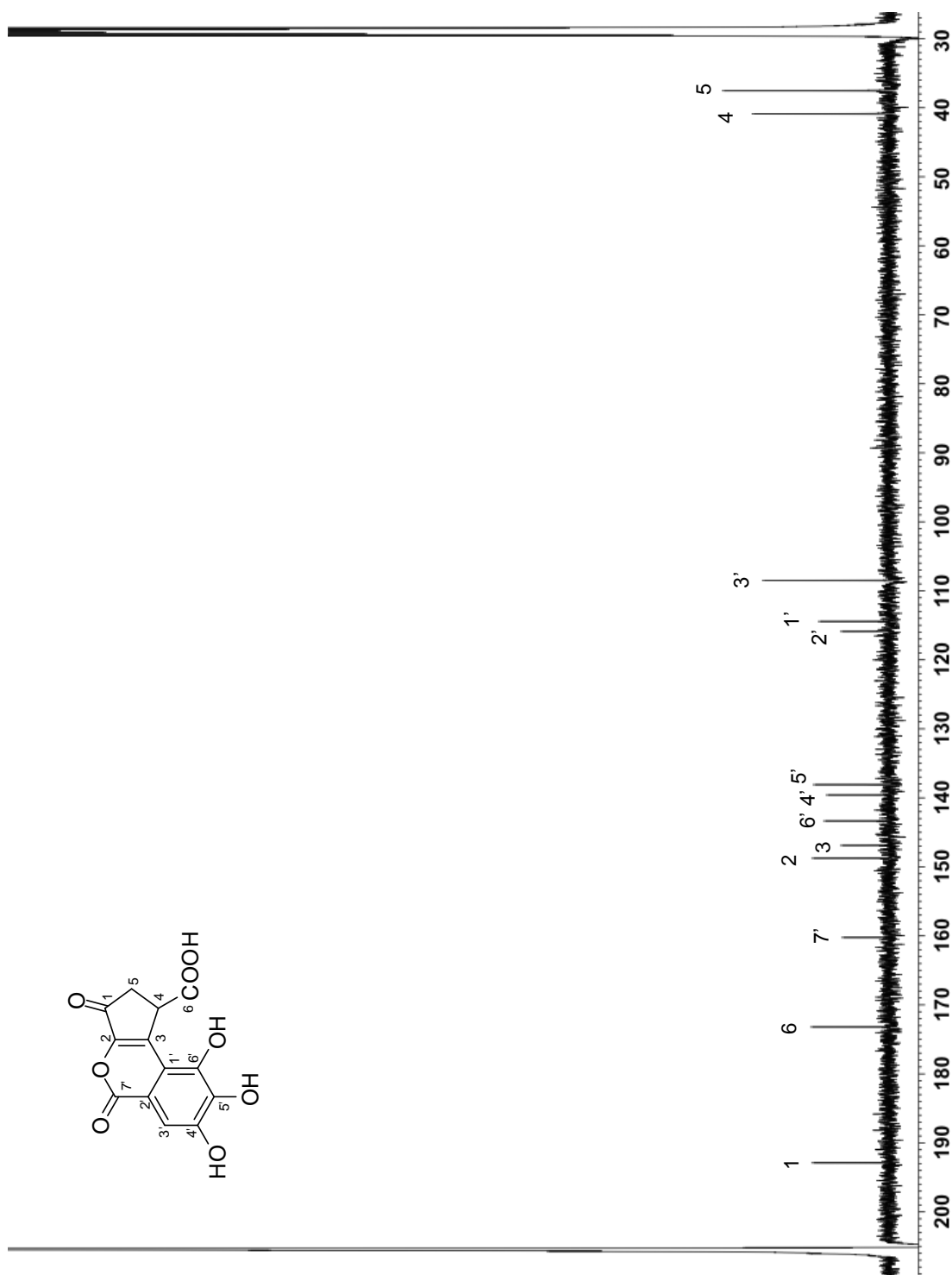
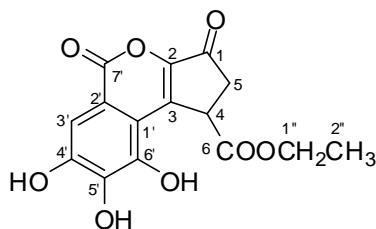


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H de **10** en acetona- d_6 a 400 MHz.



7.7 Brevifolin carboxilato de etilo (12)

Polvo café oscuro amorfo, PM = 320, punto de fusión cercano a 310°C (decomp), datos de RMN de ^1H (Fig. 13) y ^{13}C (Tabla 7).

Tabla 11. Datos de RMN de **12** y Ref.⁷³

| ^{13}C | | | ^1H | | |
|--------------------------------|-------|-------|--|--------------------|--------------------|
| δ en ppm acetona- d_6 | | | en ppm acetona- d_6 (Mult.; J en Hz) | | |
| Núm. | exp | Ref | Núm. | exp | Ref |
| 2'' | 13.5 | 13.9 | 3' | 7.41 (s) | 7.41 (s) |
| 5 | 37.5 | 36.8 | 4 | 4.53 (dd; 8, 1.8) | 4.53 (dd; 8, 1.8) |
| 4 | 40.8 | 41.0 | 1'' | 4.14 (q; 7) | 4.14 (q; 7) |
| 1'' | 60.3 | 60.7 | 5a | 3.00 (dd; 18, 8) | 3.00 (dd; 18, 8) |
| 3' | 108.5 | 108.2 | 5b | 2.48 (dd; 18, 1.8) | 2.48 (dd; 18, 1.8) |
| 1' | 113.0 | 113.1 | 2'' | 1.20 (t; 7) | 1.20 (t; 7) |
| 2' | 115.3 | 115.1 | | | |
| 5' | 138.4 | 138.5 | | | |
| 4' | 139.9 | 140.3 | | | |
| 6' | 143.4 | 143.7 | | | |
| 3 | 146.0 | 145.9 | | | |
| 2 | 149.9 | 149.7 | | | |
| 7' | 160.3 | 160.2 | | | |
| 6 | 173.2 | 172.1 | | | |
| 1 | 192.9 | 193.0 | | | |

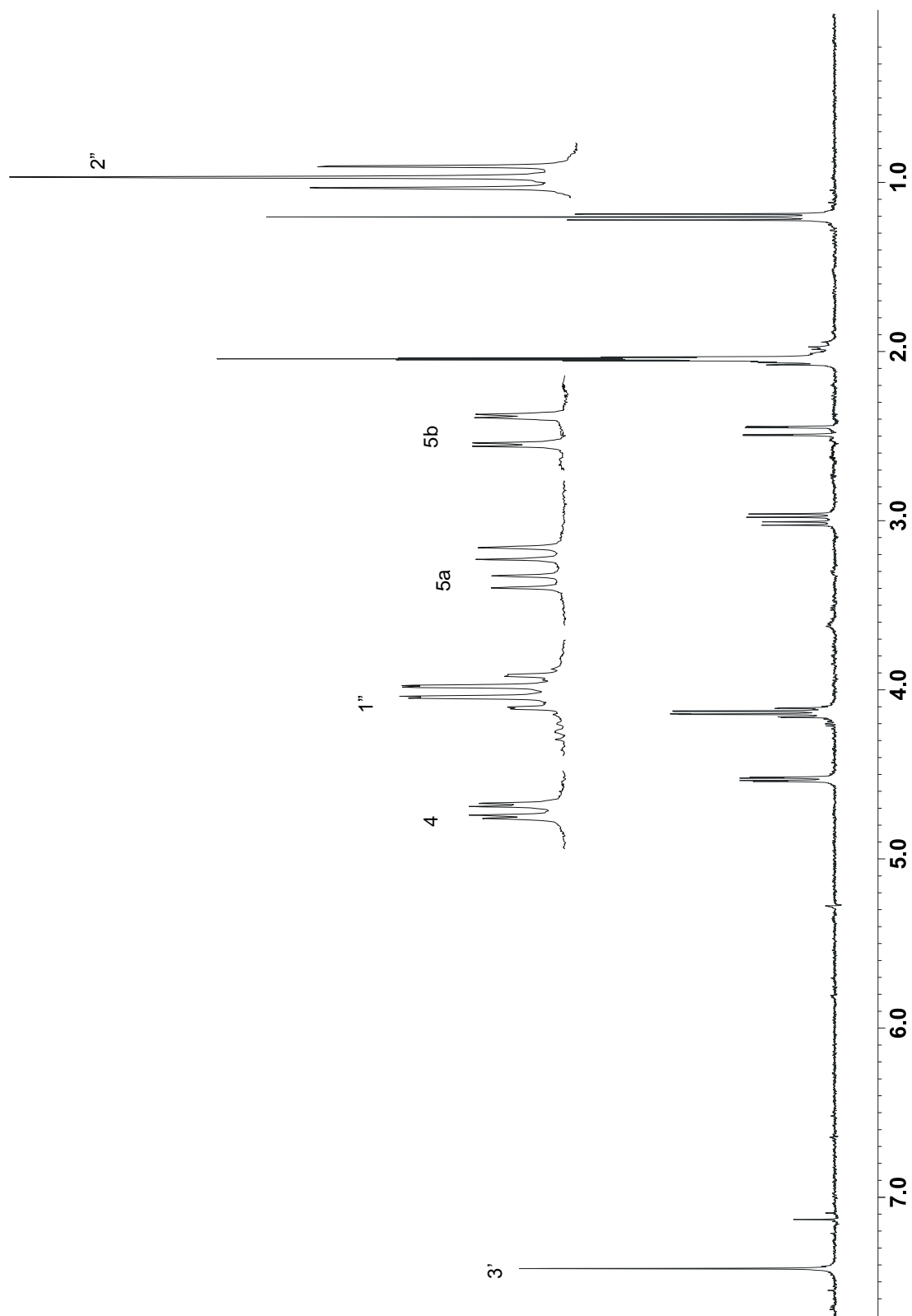
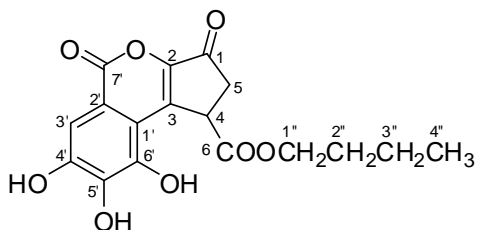


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H de **12** en acetona- d_6 a 400 MHz.



7.8 Brevifolin carboxilato de butilo (13)

Aislado como un polvo café oscuro amorfo $PM = 348$, punto de fusión $290-295^{\circ}\text{C}$ (descomp), sus datos de RMN de ^1H en acetona- d_6 (Fig. 14) y ^{13}C (Fig. 15), $R_f = 0.57$, en TLC $\text{CHCl}_3\text{-EtOH}$ (8:2). IR (KBr disk) λ_{max} 3454, 2957, 2926, 1733, 1701, 1664, 1603, 1384 cm^{-1} .

Tabla 12. Datos de RMN de 13.

| ^{13}C | δ en ppm acetona- d_6 | ^1H | en ppm acetona- d_6 (<i>Mult.</i> ; <i>J</i> en Hz) |
|-----------------|--------------------------------|--------------|--|
| Núm. | exp | Núm. | exp |
| 4'' | 13.3 | 3' | 7.29 (s) |
| 3'' | 18.9 | 4 | 4.55 (dd; 7.7, 1.8) |
| 2'' | 37.3 | 1a'' | 4.14 (dt; 6.4, 10.8) |
| 5 | 30.4 | 1b'' | 4.04 (dt; 6.4, 10.8) |
| 4 | 41.0 | 5a | 3.03 (dd; 18.7, 7.7) |
| 1'' | 65.5 | 5b | 2.48 (dd; 18.7, 1.8) |
| 3' | 108.6 | 2'' | 1.58 (m; 6.6) |
| 1' | 114.4 | 3'' | 1.29 (m; 7) |
| 2' | 115.6 | 4'' | 0.86 (t; 7) |
| 5' | 137.8 | | |
| 4' | 139.3 | | |
| 6' | 142.9 | | |
| 3 | 146.9 | | |
| 2 | 148.8 | | |
| 7' | 160.1 | | |
| 6 | 172.3 | | |
| 1 | 192.4 | | |

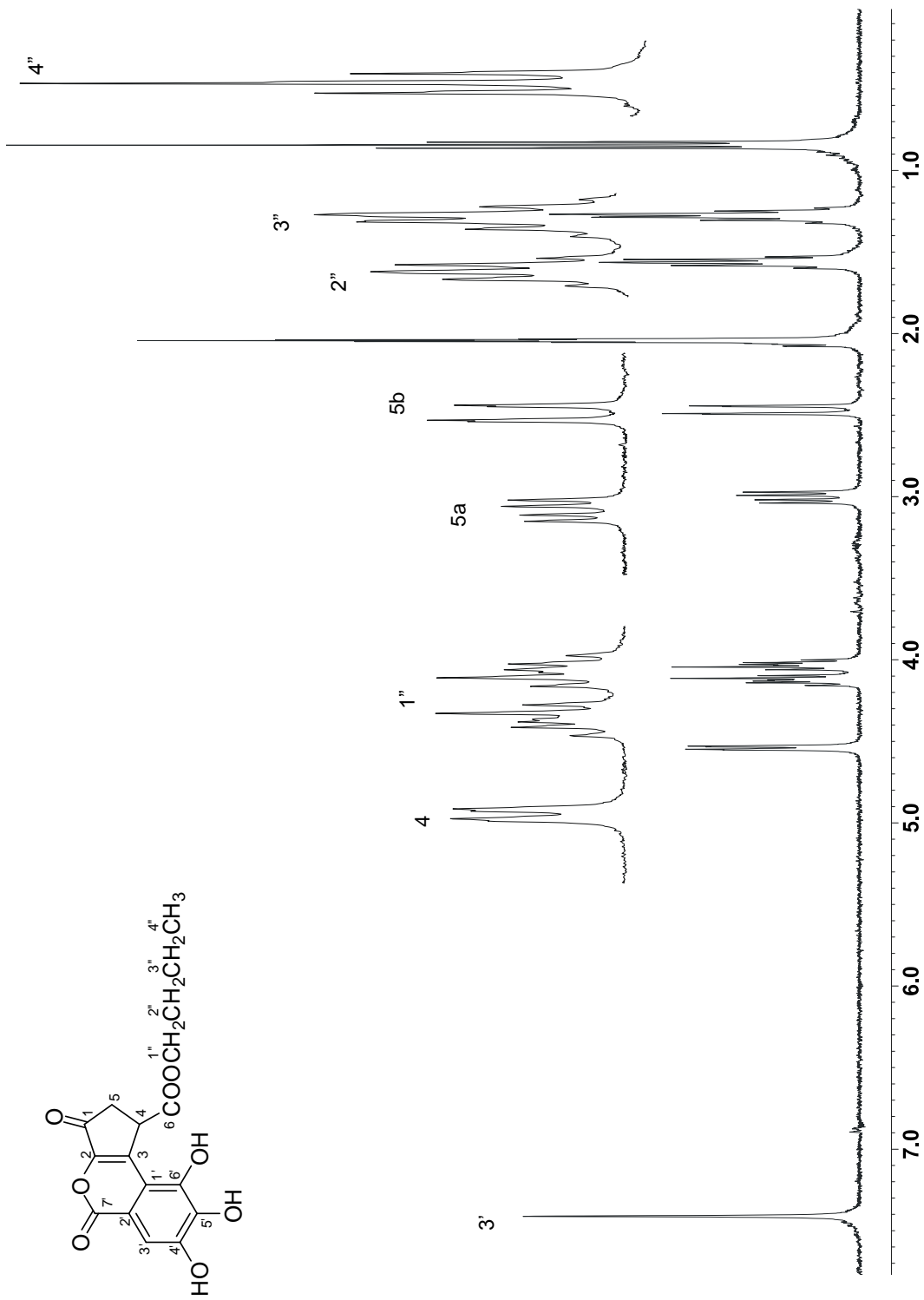


Figura 14. Espectro de RMN de ¹H de 13 en acetona-d₆ a 400 MHz.

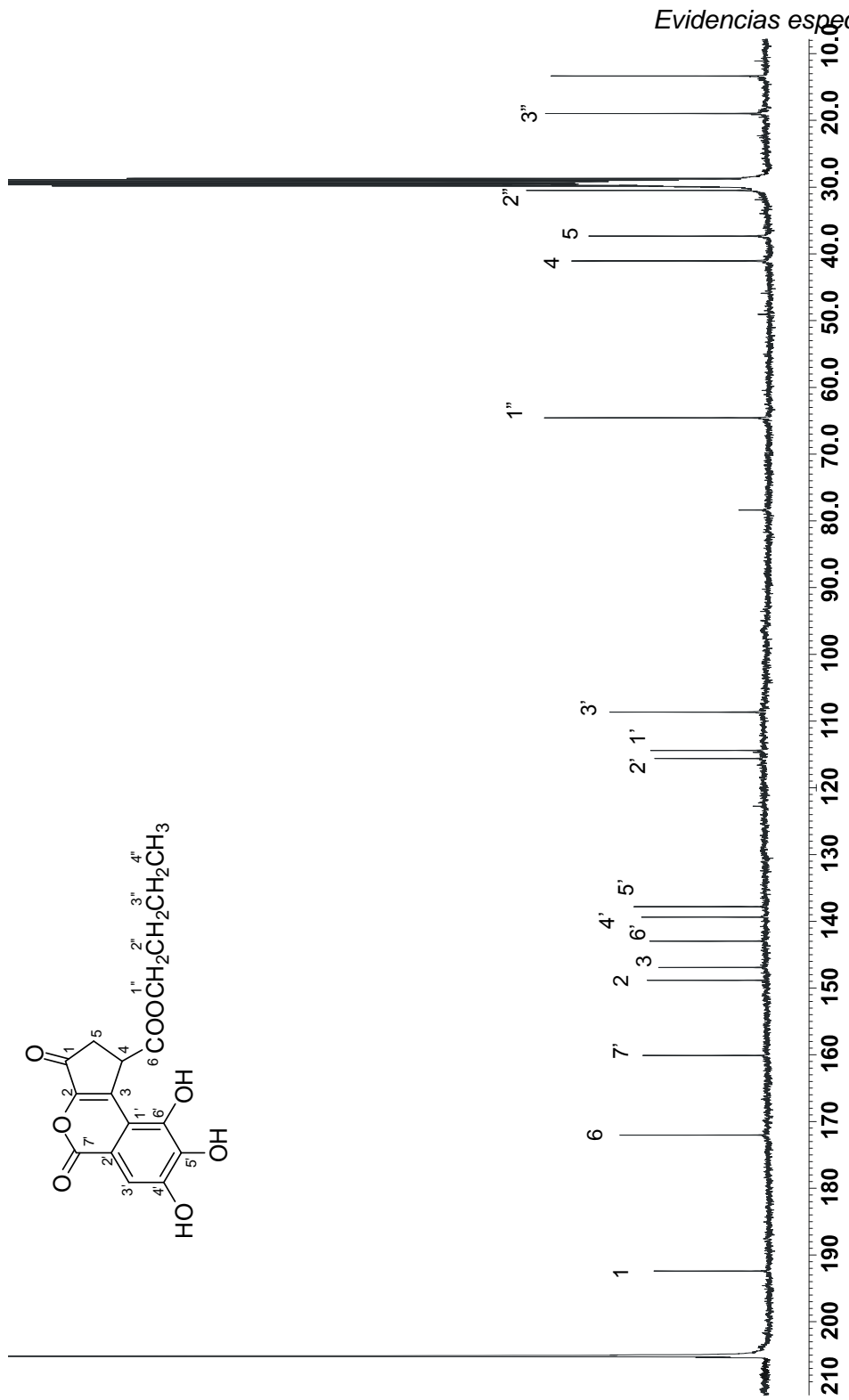
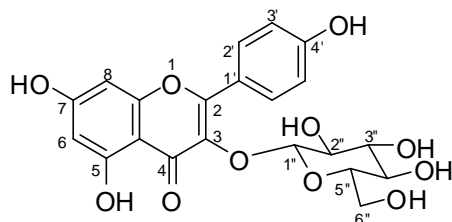


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C de **13** en acetona- d_6 a 100 MHz.



7.9 3-O-β-D-Glucósido de kaempferol (**16**)

Polvo amarillo amorfo, sólido amorfo amarillo con PM = 448, punto de fusión de 206-209 °C. Los datos espectroscópicos de RMN de ^1H (Fig. 16) y de ^{13}C (Fig. 17) se compararon con la literatura.

Tabla 13. Datos de RMN de **16** y Ref.⁶⁸

| ^{13}C Núm. | δ en ppm CD_3OD | | ^1H Núm. | en ppm CD_3OD (<i>Mult.</i> ; <i>J</i> en Hz) | |
|-------------------------|--|-------|----------------------|--|------------------------------------|
| | exp | ref | | exp | ref |
| 2 | 158.4 | 158.6 | 2' | 8.07 (<i>d</i> ; 8.0) | 8.07 (<i>d</i> ; 8.0) |
| 3 | 135.3 | 135.4 | 6' | 8.07 (<i>d</i> ; 8.0) | 8.07 (<i>d</i> ; 8.0) |
| 4 | 179.4 | 175.4 | 3' | 6.87 (<i>d</i> ; 8.0) | 6.87 (<i>d</i> ; 8.0) |
| 5 | 161.4 | 163.0 | 5' | 6.87 (<i>d</i> ; 8.0) | 6.87 (<i>d</i> ; 8.0) |
| 6 | 99.7 | 100.2 | 8 | 6.37 (<i>d</i> ; 2.2) | 6.37 (<i>d</i> ; 2.2) |
| 7 | 165.9 | 166.9 | 6 | 6.19 (<i>d</i> ; 2.2) | 6.19 (<i>d</i> ; 2.2) |
| 8 | 94.6 | 95.1 | 1'' | 5.24 (<i>d</i> ; 6.6) | 5.24 (<i>d</i> ; 6.6) |
| 9 | 158.9 | 158.9 | 2'' | 3.42 (<i>t</i> ; 6.0) | 3.42 (<i>t</i> ; 6.0) |
| 10 | 105.2 | 105.5 | 6''a | 3.66 (<i>dd</i> ; 12.2, 6.0) | 3.66 (<i>dd</i> ; 12.2, 6.0) |
| 1' | 122.6 | 122.8 | 6''b | 3.48 (<i>dd</i> ; 12.0, 2.2) | 3.48 (<i>dd</i> ; 12.0, 2.2) |
| 2' | 132.1 | 132.3 | 5'' | 3.17 (<i>ddd</i> ; 9.5, 5.5, 2.2) | 3.17 (<i>ddd</i> ; 9.5, 5.5, 2.2) |
| 3' | 115.9 | 116.0 | | | |
| 4' | 162.9 | 165.5 | | | |
| 5' | 115.9 | 116.0 | | | |
| 6' | 132.1 | 132.3 | | | |
| 1'' | 103.9 | 104.2 | | | |
| 2'' | 75.6 | 75.7 | | | |
| 3'' | 78.2 | 78.4 | | | |
| 4'' | 71.2 | 71.3 | | | |
| 5'' | 77.9 | 78.0 | | | |
| 6'' | 62.4 | 62.6 | | | |

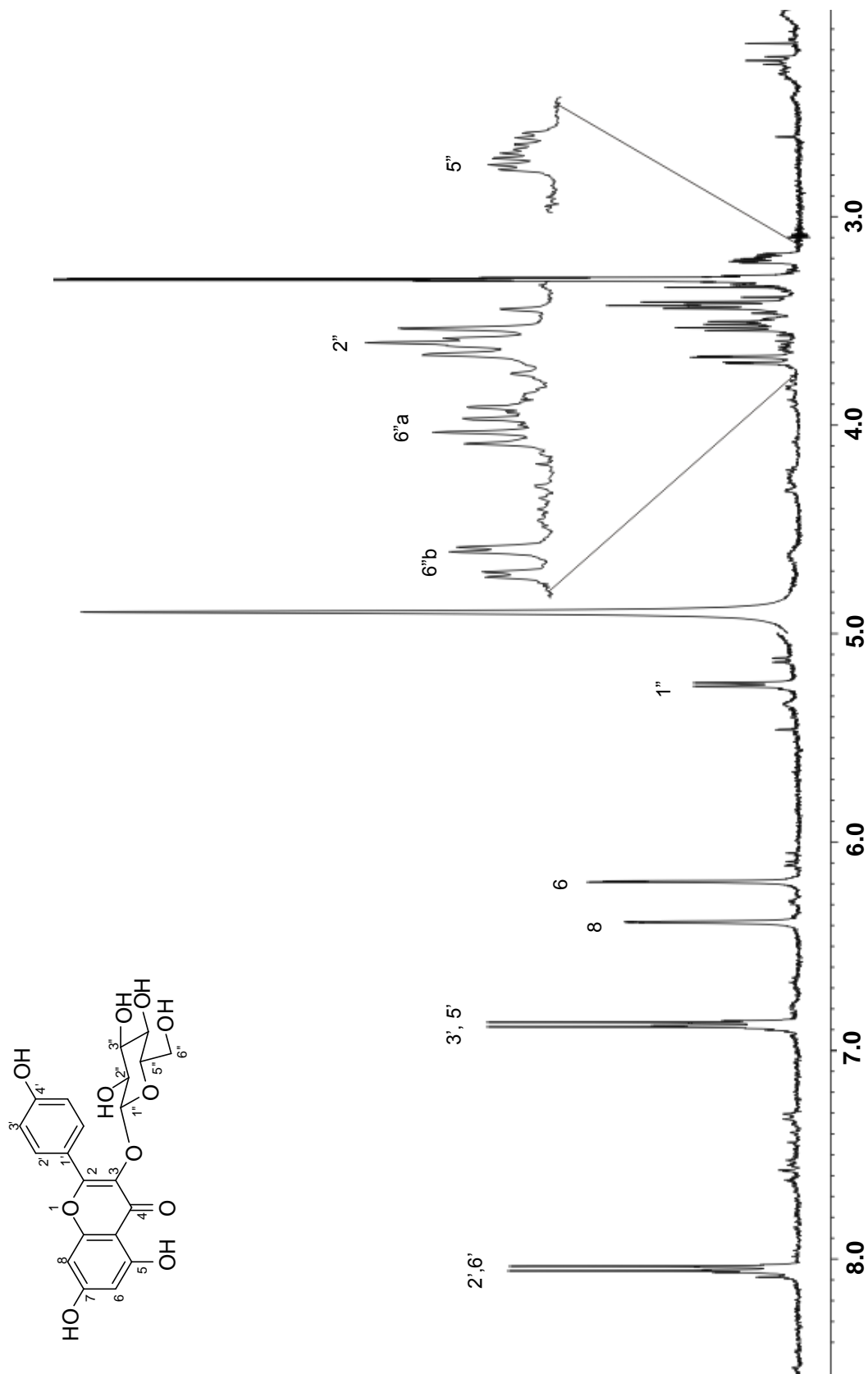


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H de 16 en CD_3OD a 400 MHz.

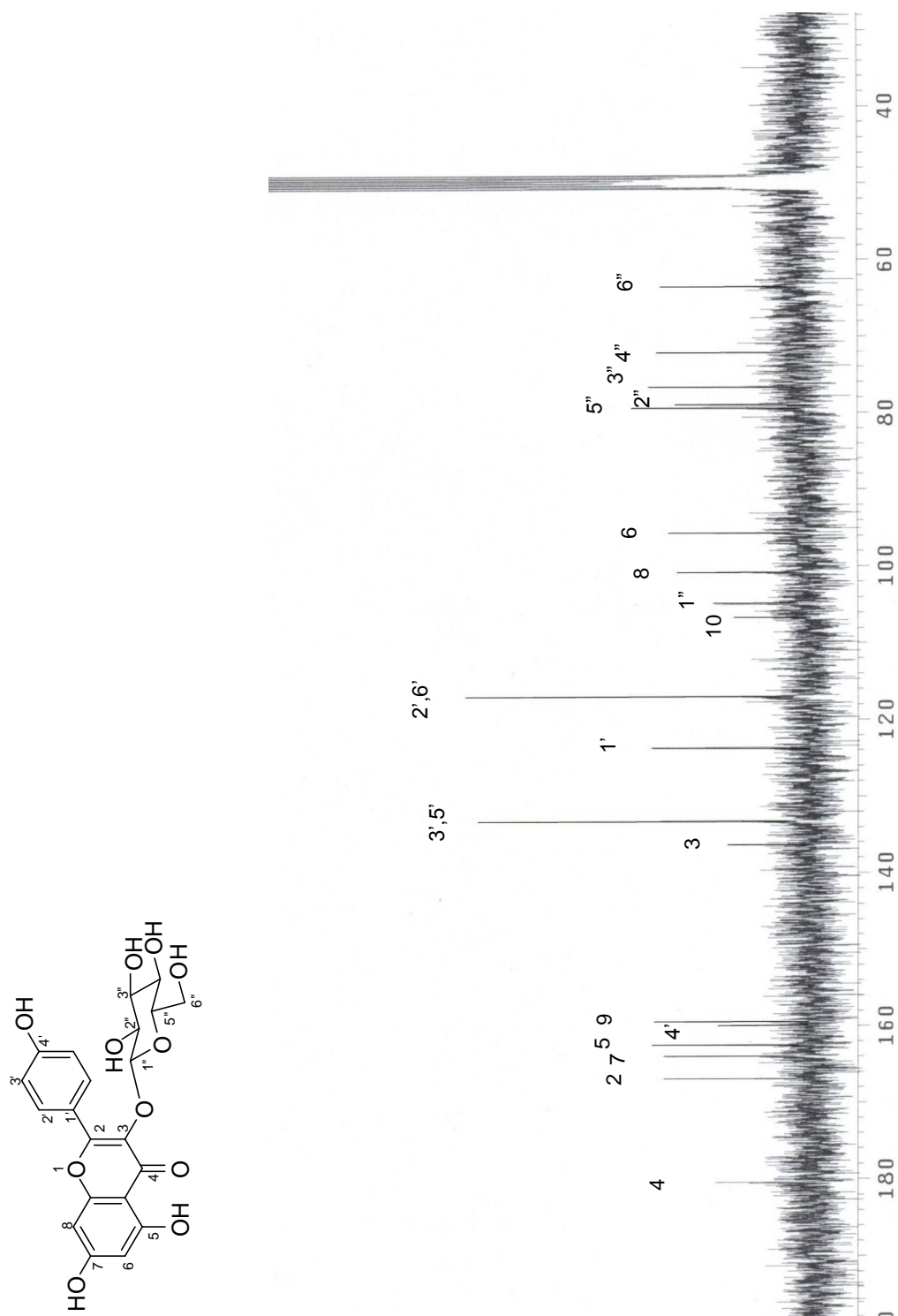
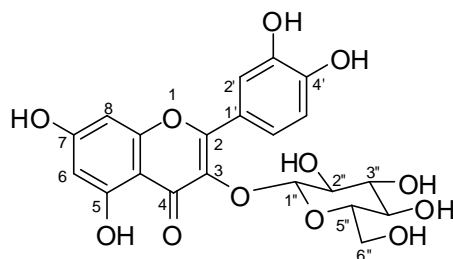


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C de **16** en CD_3OD a 100 MHz.



7.10 3-O-β-D-Glucósido de quercetina (17)

Sólido amorfo amarillo PM = 464, fueron obtenidos sus datos espectroscópicos de RMN de ^1H (Fig. 18) ^{13}C (Fig. 19).

Tabla 14. Datos de RMN de **17** y Ref.⁶⁹

| ^{13}C Núm. | δ en ppm CD_3OD | | ^1H Núm. | en ppm CD_3OD (<i>Mult.</i> ; <i>J</i> en Hz) | |
|-------------------------|--|--------|----------------------|--|------------------------------------|
| | exp | ref | | exp | ref |
| 2 | 158.3 | 158.3 | 2' | 7.07 (<i>d</i> ; 2.2) | 7.07 (<i>d</i> ; 2.2) |
| 3 | 135.5 | 135.6 | 6' | 7.56 (<i>d</i> ; 8.0, 2.2) | 7.56 (<i>d</i> ; 8.0, 2.2) |
| 4 | 179.3 | 179.4 | 5' | 6.85 (<i>d</i> ; 8.8) | 6.85 (<i>d</i> ; 8.8) |
| 5 | 162.8 | 162.9 | 8 | 6.35 (<i>d</i> ; 2.2) | 6.35 (<i>d</i> ; 2.2) |
| 6 | 99.7 | 99.9 | 6 | 6.18 (<i>d</i> ; 2.2) | 6.18 (<i>d</i> ; 2.2) |
| 7 | 165.8 | 165.9 | 1'' | 5.24 (<i>d</i> ; 7.3) | 5.24 (<i>d</i> ; 7.3) |
| 8 | 94.6 | 94.70 | 2'' | 3.48 (<i>t</i> ; 9.0) | 3.48 (<i>t</i> ; 9.0) |
| 9 | 158.8 | 158.60 | 3'' | 3.42 (<i>t</i> ; 9.0) | 3.42 (<i>t</i> ; 9.0) |
| 10 | 105.5 | 105.60 | 4'' | 3.35 (<i>t</i> ; 9.0) | 3.35 (<i>t</i> ; 9.0) |
| 1' | 122.9 | 122.80 | 6''a | 3.70 (<i>dd</i> ; 12.0, 2.2) | 3.70 (<i>dd</i> ; 12.0, 2.2) |
| 2' | 115.8 | 116.20 | 6''b | 3.66 (<i>dd</i> ; 12.0, 6.0) | 3.66 (<i>dd</i> ; 12.0, 6.0) |
| 3' | 145.7 | 145.90 | 5'' | 3.17 (<i>ddd</i> ; 9.5, 5.5, 2.2) | 3.17 (<i>ddd</i> ; 9.5, 5.5, 2.2) |
| 4' | 149.7 | 148.50 | | | |
| 5' | 117.4 | 117.50 | | | |
| 6' | 123.0 | 123.10 | | | |
| 1'' | 104.2 | 102.50 | | | |
| 2'' | 75.5 | 75.40 | | | |
| 3'' | 78.2 | 78.30 | | | |
| 4'' | 71.0 | 71.20 | | | |
| 5'' | 77.9 | 78.00 | | | |
| 6'' | 62.4 | 62.40 | | | |

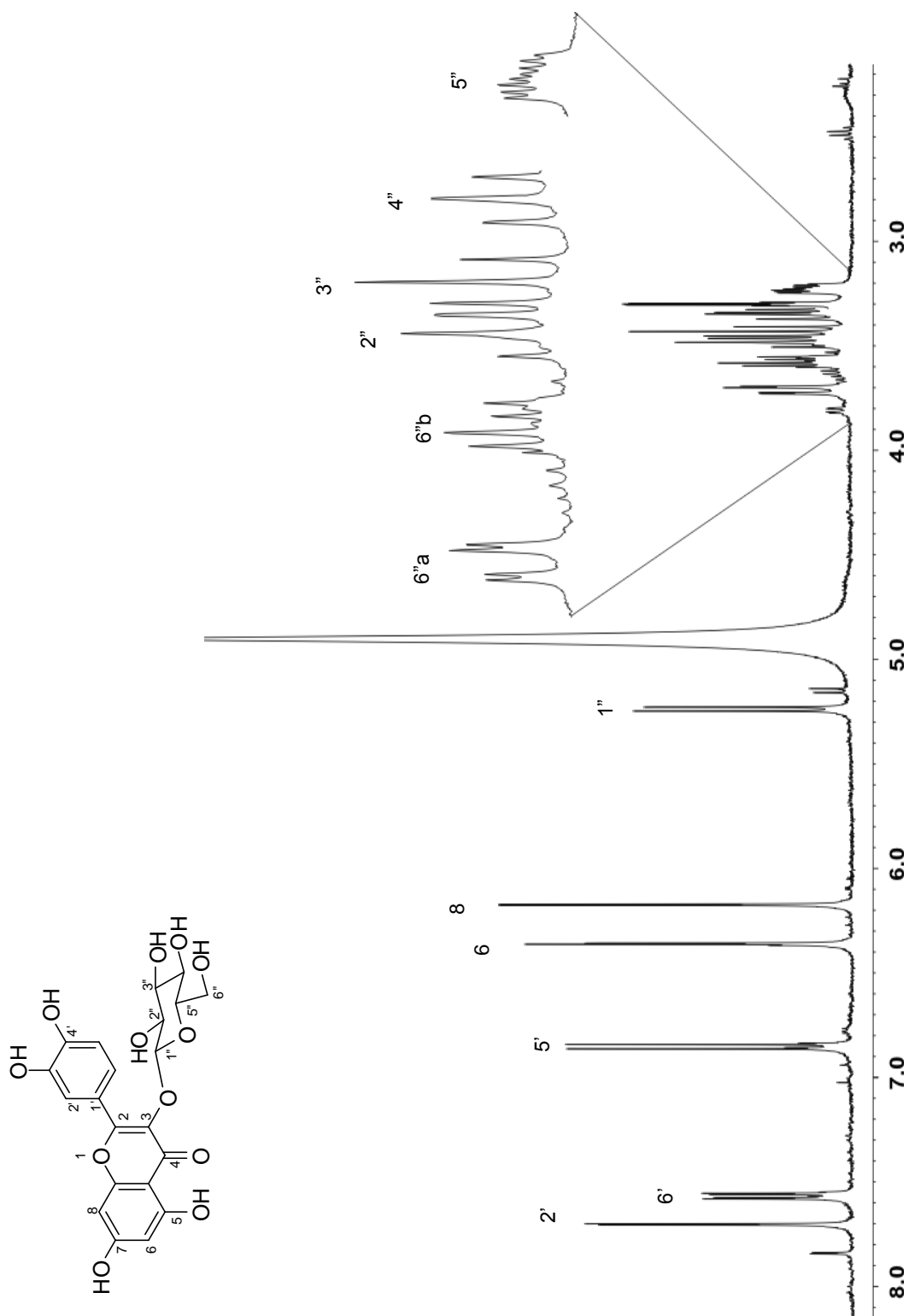


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H de 17 en CD_3OD a 400 MHz.

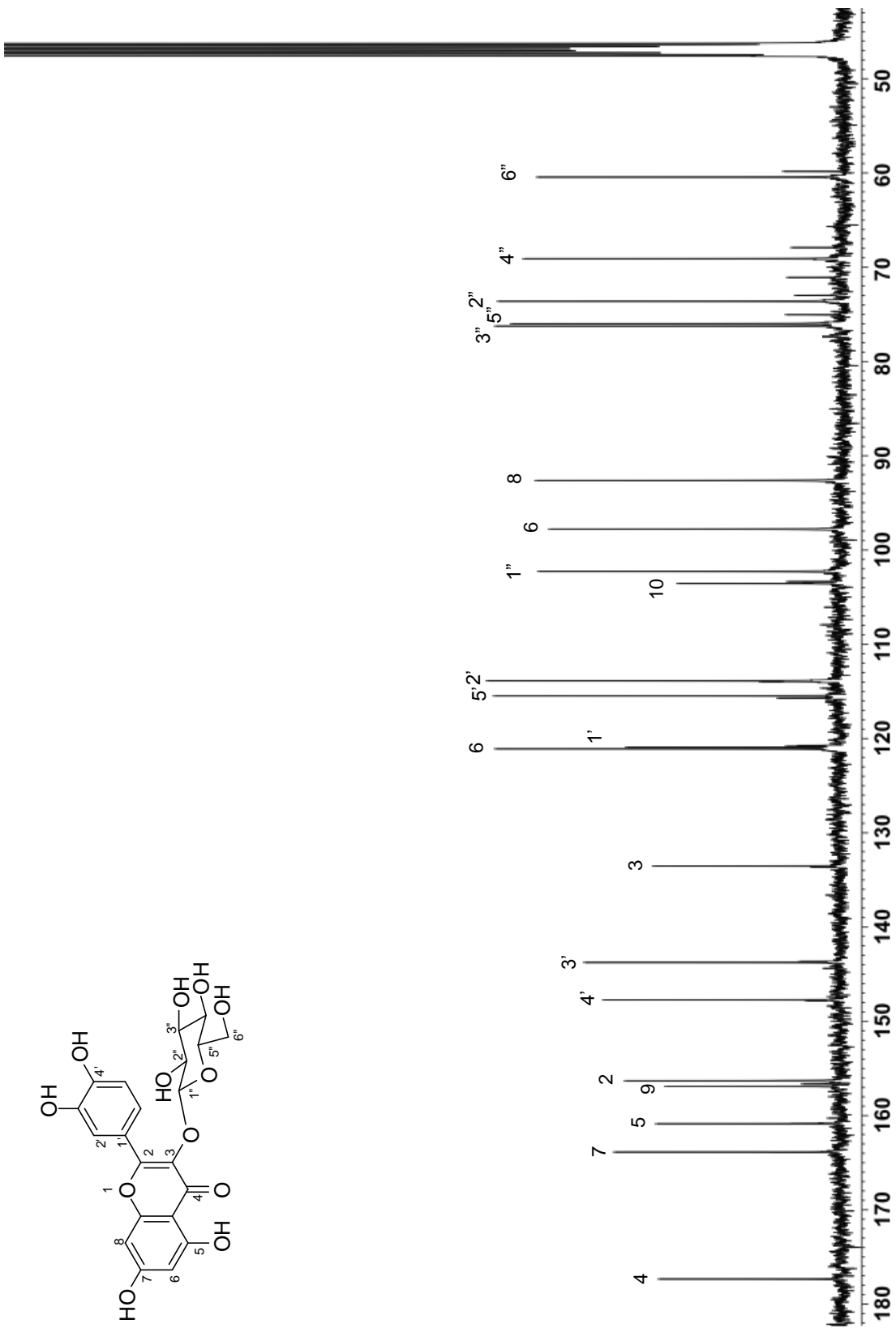
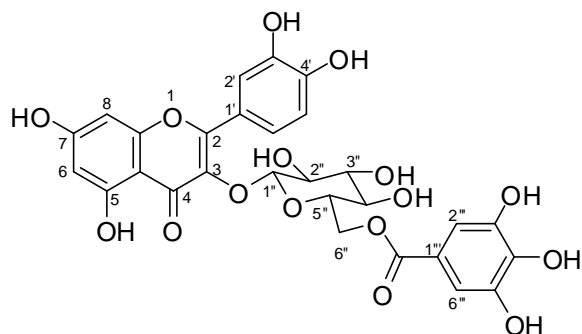


Figura 19. Espectro de RMN de ^{13}C de 17 en CD_3OD a 100 MHz.



7.11 3-O- β -D-(6''-galloil)-glucósido de quercetina (**18**)

De los flavonoides aislados **18** en su espectro de RMN ^1H (figura 20), a diferencia de los anteriores se aprecia, en 6.85 una señal simple para dos hidrógenos de H-2'' y H-6'', característico de un residuo galloilo. PM = 616 g/mol,

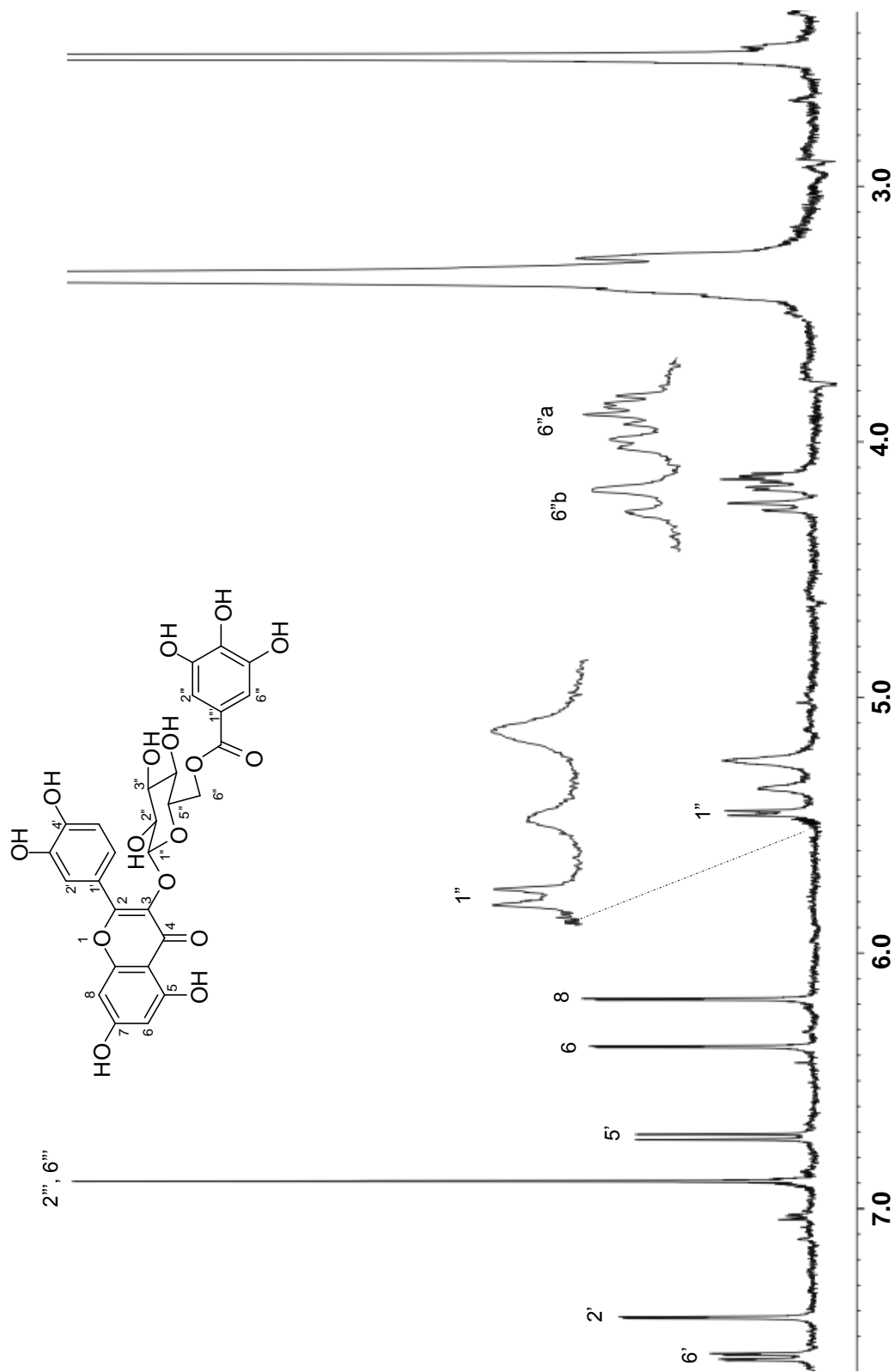


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H de 18 en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.

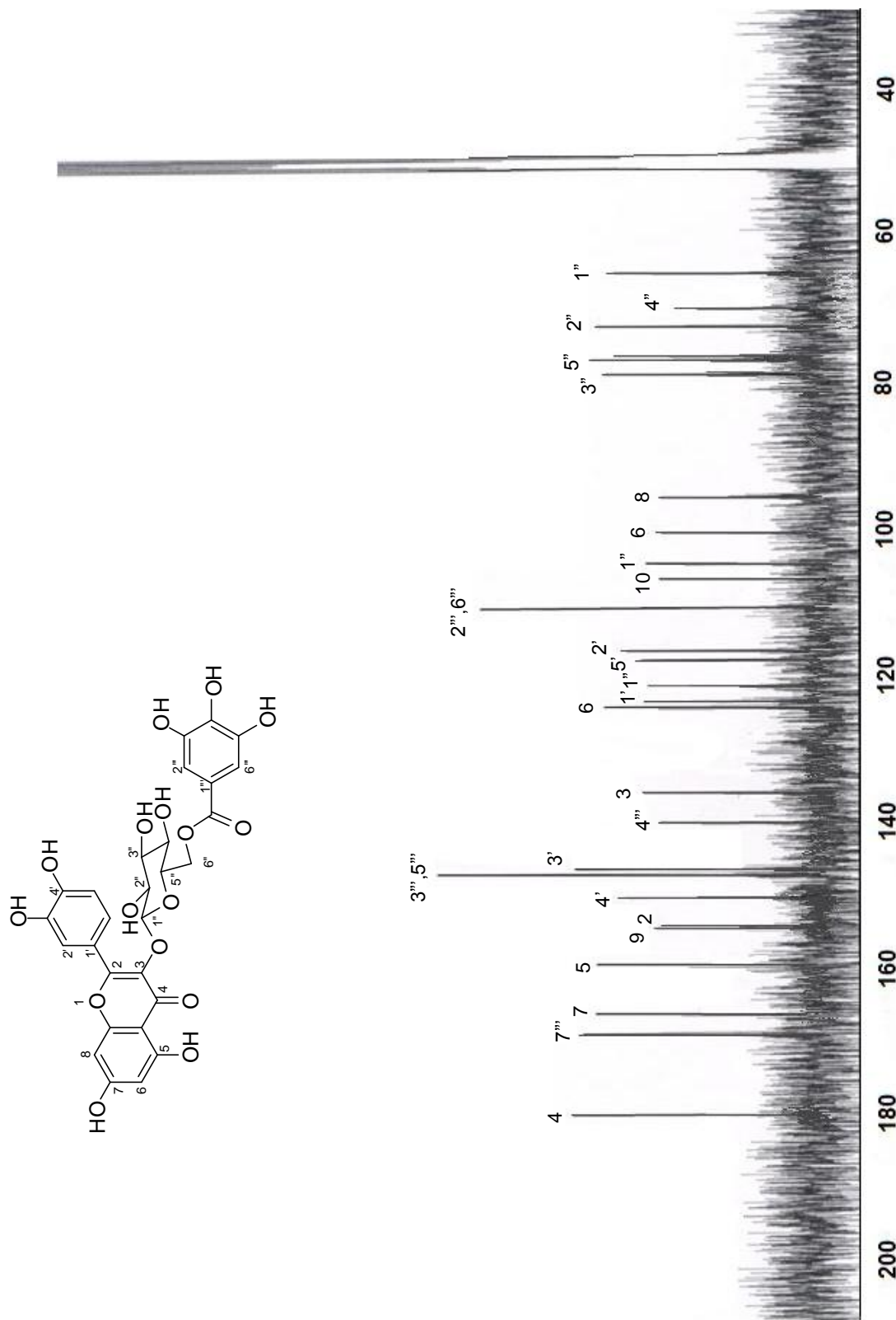
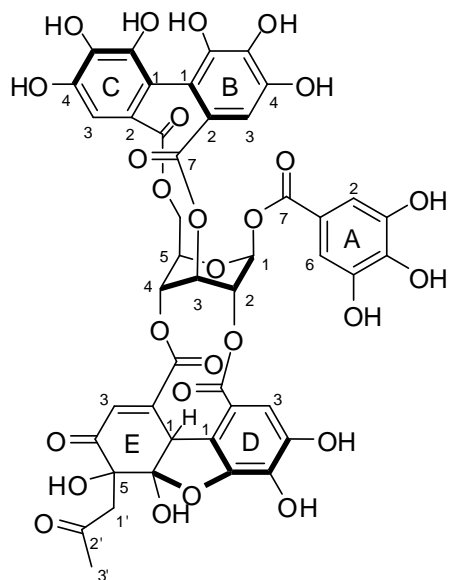


Figura 21. Espectro de RMN de ¹³C de 18 en CD₃OD a 100 MHz.

Tabla 15. Datos de RMN de **18** y Ref.⁶⁹

| ¹³ C | | | ¹³ C | | |
|-----------------|--------------------------------------|-------|-----------------|--------------------------------------|-------|
| Núm. | δ en ppm DMSO- <i>d</i> ₆ | | Núm. | δ en ppm DMSO- <i>d</i> ₆ | |
| | exp | ref | | exp | ref |
| 2 | 156.4 | 156.4 | 3" | 76.3 | 76.4 |
| 3 | 133.4 | 133.4 | 4" | 67.8 | 69.6 |
| 4 | 177.4 | 177.4 | 5" | 74.1 | 74.2 |
| 5 | 161.5 | 161.3 | 6" | 63.0 | 63.2 |
| 6 | 98.8 | 98.8 | 1''' | 119.4 | 119.4 |
| 7 | 165.5 | 164.3 | 2''', 6''' | 108.7 | 108.7 |
| 8 | 103.9 | 103.7 | 3''', 5''' | 145.5 | 145.5 |
| 9 | 156.6 | 156.5 | 4''' | 138.5 | 138.5 |
| 10 | 104.0 | 104.0 | 7''' | 165.6 | 165.8 |
| 1' | 121.2 | 121.1 | | | |
| 2' | 115.4 | 115.4 | | | |
| 3' | 145.0 | 144.9 | | | |
| 4' | 148.4 | 148.5 | | | |
| 5' | 115.7 | 115.8 | | | |
| 6' | 121.9 | 122.0 | | | |
| 1" | 101.4 | 101.4 | | | |
| 2" | 75.8 | 74.1 | | | |

| ¹ H | | |
|----------------|---|-------------------------------|
| Núm. | en ppm DMSO- <i>d</i> ₆ (<i>Mult.</i> ; <i>J</i> en Hz) | |
| | Exp | ref |
| 6' | 7.54 (<i>dd</i> ; 8.0, 2.2) | 7.54 (<i>dd</i> ; 8.0, 2.2) |
| 2' | 7.38 (<i>d</i> ; 2.0) | 7.38 (<i>d</i> ; 2.0) |
| 2''', 6''' | 6.85 (<i>s</i>) | 6.85 (<i>s</i>) |
| 5' | 6.67 (<i>d</i> ; 8.0) | 6.67 (<i>d</i> ; 8.0) |
| 8 | 6.32 (<i>d</i> ; 2.2) | 6.32 (<i>d</i> ; 2.2) |
| 6 | 6.14 (<i>d</i> ; 2.2) | 6.14 (<i>d</i> ; 2.2) |
| 1'' | 5.41 (<i>d</i> ; 7.0) | 5.41 (<i>d</i> ; 7.0) |
| 6''a | 4.11 (<i>dd</i> ; 12.0, 5.0) | 4.11 (<i>dd</i> ; 12.0, 5.0) |
| 6''b | 4.22 (<i>dd</i> ; 12.0, 3.0) | 4.22 (<i>dd</i> ; 12.0, 3.0) |



7.12 Acetonil geraniina (19)

Polvo amarillo amorfo con $PM = 992$, $[\alpha]_D^{22} - 115.7^\circ$ sus datos de RMN 1H (Fig. 21) y de ^{13}C (Fig. 22, Tabla 12).

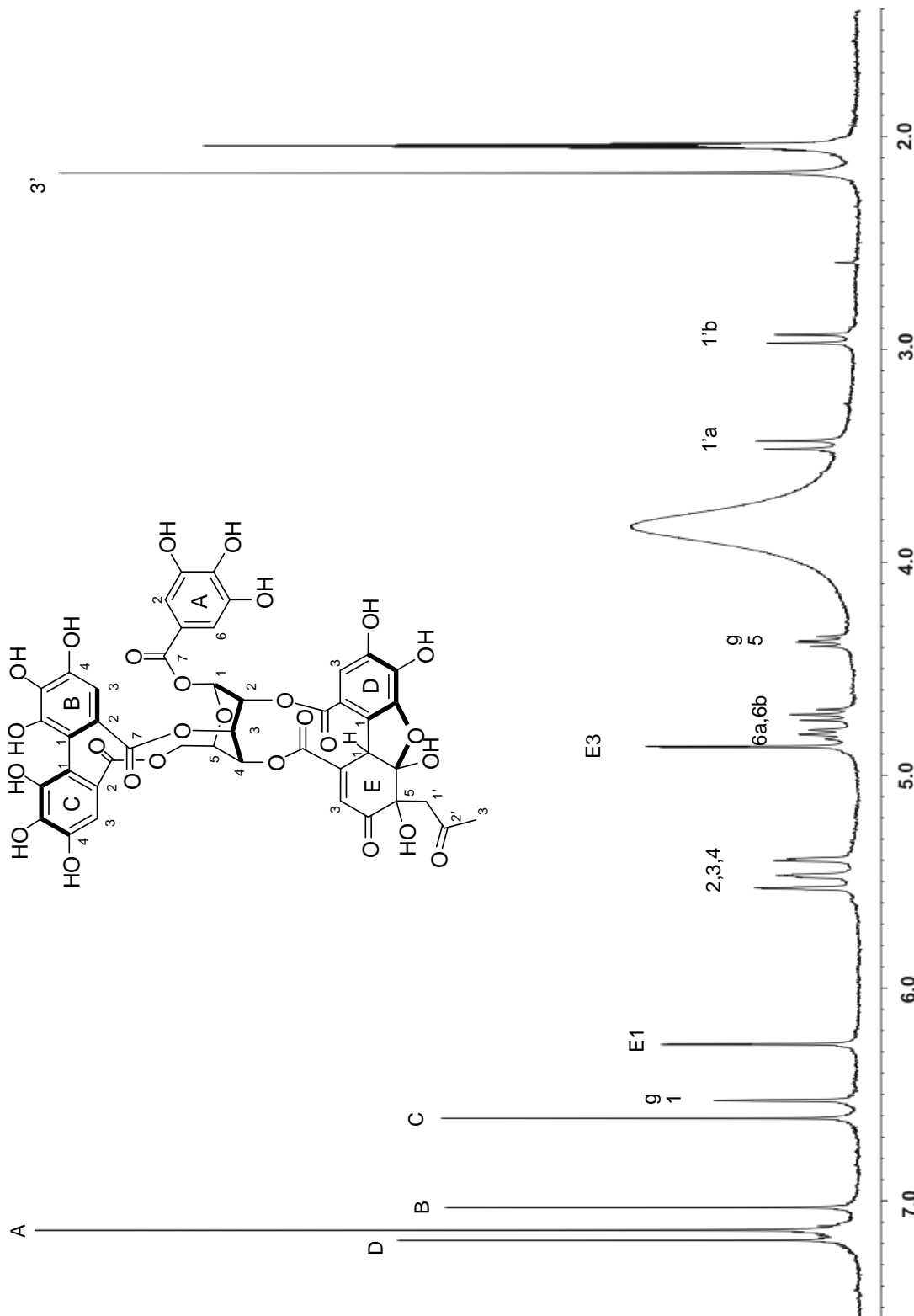


Figura 22. Espectro de RMN de ¹H de 19 en acetona-d₆ a 400 MHz.

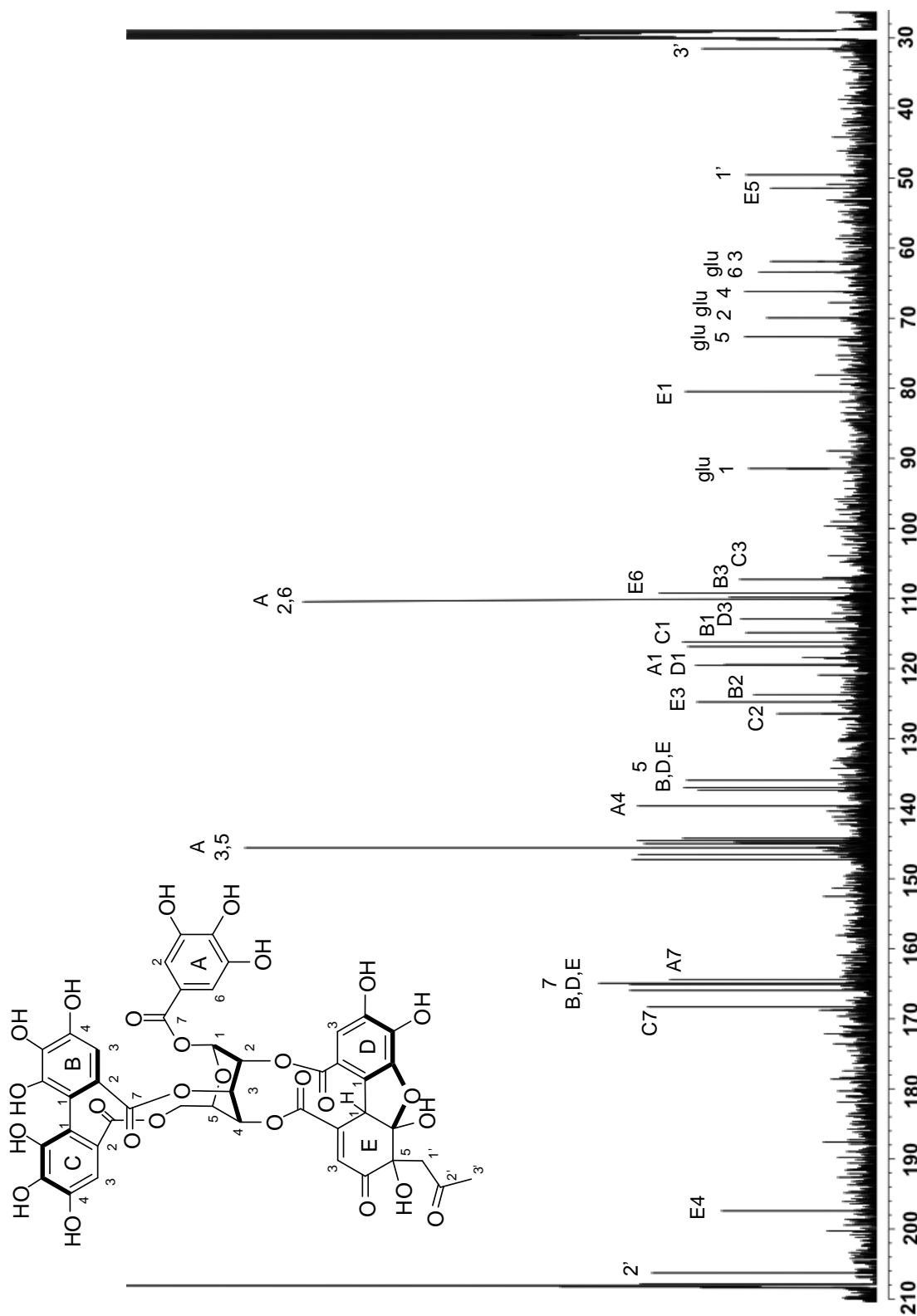


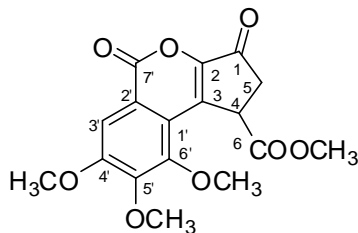
Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C de 19 en acetona- d_6 a 100 MHz.

Tabla 16. Datos de RMN de **19** y Ref.⁷⁰

| ¹³ C | | | ¹³ C | | |
|-----------------|--------------------------------------|-------|-----------------|--------------------------------------|-------|
| Núm. | δ en ppm DMSO- <i>d</i> ₆ | | Núm. | δ en ppm DMSO- <i>d</i> ₆ | |
| | exp | Ref | | exp | Ref |
| 1' | 49.2 | 49.8 | D4 | 146.2 | 147.5 |
| 2' | 206.0 | 206.2 | D5 | 136.6 | 137.2 |
| 3' | 31.2 | 31.8 | D6 | 146.9 | 146.8 |
| 1glu | 91.1 | 91.7 | D7 | 164.7 | 165.3 |
| 2glu | 69.6 | 70.1 | E1 | 80.2 | 80.8 |
| 3glu | 61.6 | 62.2 | E2 | 144.5 | 144.9 |
| 4glu | 65.8 | 66.5 | E3 | 126.1 | 126.9 |
| 5glu | 72.3 | 73.0 | E4 | 197.1 | 197.6 |
| 6glu | 63.1 | 63.7 | E5 | 51.1 | 51.8 |
| A1 | 119.1 | 119.0 | E6 | 108.9 | 109.7 |
| A2,6 | 109.8 | 110.7 | E7 | 164.6 | 165.0 |
| A3,5 | 145.2 | 146.9 | | | |
| A4 | 139.3 | 139.9 | | | |
| A7 | 164.1 | 164.6 | | | |
| B1 | 114.6 | 115.1 | | | |
| B2 | 123.4 | 124.4 | | | |
| B3 | 109.5 | 110.3 | | | |
| B4 | 144.3 | 144.6 | | | |
| B5 | 137.0 | 137.8 | | | |
| B6 | 144.6 | 145.4 | | | |
| B7 | 165.6 | 166.1 | | | |
| C1 | 115.9 | 116.9 | | | |
| C2 | 124.6 | 125.4 | | | |
| C3 | 107.0 | 107.9 | | | |
| C4 | 143.9 | 144.4 | | | |
| C5 | 136.6 | 136.5 | | | |
| C6 | 144.7 | 145.9 | | | |
| C7 | 167.9 | 168.4 | | | |
| D1 | 119.2 | 119.1 | | | |
| D2 | 116.5 | 117.8 | | | |
| D3 | 112.6 | 113.3 | | | |
| D4 | 146.2 | 147.5 | | | |

Continuación **Tabla 15.** Comparación de desplazamientos de **19** y Ref.⁷⁰

| ¹ H | | en ppm CDCl ₃ (<i>Mult.</i> ; <i>J</i> en Hz) | |
|----------------|-------------------------------|---|--|
| Núm. | Exp | Ref | |
| 3' | 2.17 (<i>s</i>) | 2.17 (<i>s</i>) | |
| 1'a | 2.95 (<i>d</i> ; 15.4) | 2.95 (<i>d</i> ; 15.4) | |
| 1'b | 3.44 (<i>d</i> ; 15.4) | 3.44 (<i>d</i> ; 15.4) | |
| 5-glu | 4.36 (<i>dd</i> ; 11.0, 8.0) | 4.36 (<i>dd</i> ; 11.0, 8.0) | |
| 6a-glu | 4.70 (<i>t</i> ; 16.0) | 4.70 (<i>t</i> ; 16.0) | |
| 6b-glu | 4.80 (<i>t</i> ; 8.0) | 4.80 (<i>t</i> ; 8.0) | |
| E1 | 4.86 (<i>d</i> ; 1.0) | 4.86 (<i>d</i> ; 1.0) | |
| 4-glu | 5.40 (<i>bs</i>) | 5.40 (<i>bs</i>) | |
| 3-glu | 5.47 (<i>bs</i>) | 5.47 (<i>bs</i>) | |
| 2-glu | 5.52 (<i>bs</i>) | 5.52 (<i>bs</i>) | |
| E3 | 6.26 (<i>d</i> ; 1.0) | 6.26 (<i>d</i> ; 1.0) | |
| 1-glu | 6.53 (<i>bs</i>) | 6.53 (<i>bs</i>) | |
| C3 | 6.60 (<i>s</i>) | 6.60 (<i>s</i>) | |
| B3 | 7.03 (<i>s</i>) | 7.03 (<i>s</i>) | |
| A2, 6 | 7.14 (<i>s</i>) | 7.14 (<i>s</i>) | |
| D3 | 7.18 (<i>s</i>) | 7.18 (<i>s</i>) | |



7.13 tri-O-Metilbrevifolin carboxilato de metilio (**20**)

Se obtuvo como unas agujas blancas muy finas, su PM = 348, su datos de RMN de ^1H se muestran en la Tabla 13 (Fig. 24).

Tabla 17. Datos de RMN de **20** y Ref.⁷⁴

| ^1H | δ en ppm (<i>Mult.</i> ; <i>J</i> en Hz) | |
|----------------------|--|--------------------------------|
| Núm. | Exp | Ref |
| H-5b | 2.54 (<i>dd</i> ; 18.0, 2.2) | 2.55 (<i>dd</i> ; 18.0, 2.2) |
| H-5a | 3.01 (<i>dd</i> ; 19.0, 8.0) | 2.96 (<i>dd</i> ; 18.5, 8.04) |
| OMe _{éster} | 3.71 (<i>s</i>) | 3.72 (<i>s</i>) |
| OMe _{fenol} | 3.98 (<i>s</i>) | 3.93 (<i>s</i>) |
| OMe _{fenol} | 4.01 (<i>s</i>) | 3.97 (<i>s</i>) |
| OMe _{fenol} | 4.07 (<i>s</i>) | 3.98 (<i>s</i>) |
| H-4 | 4.46(<i>dd</i> ; 8.0, 2.0) | 4.33(<i>dd</i> ; 8.04, 2.5) |
| H-3' | 7.62 (<i>s</i>) | 7.60 (<i>s</i>) |

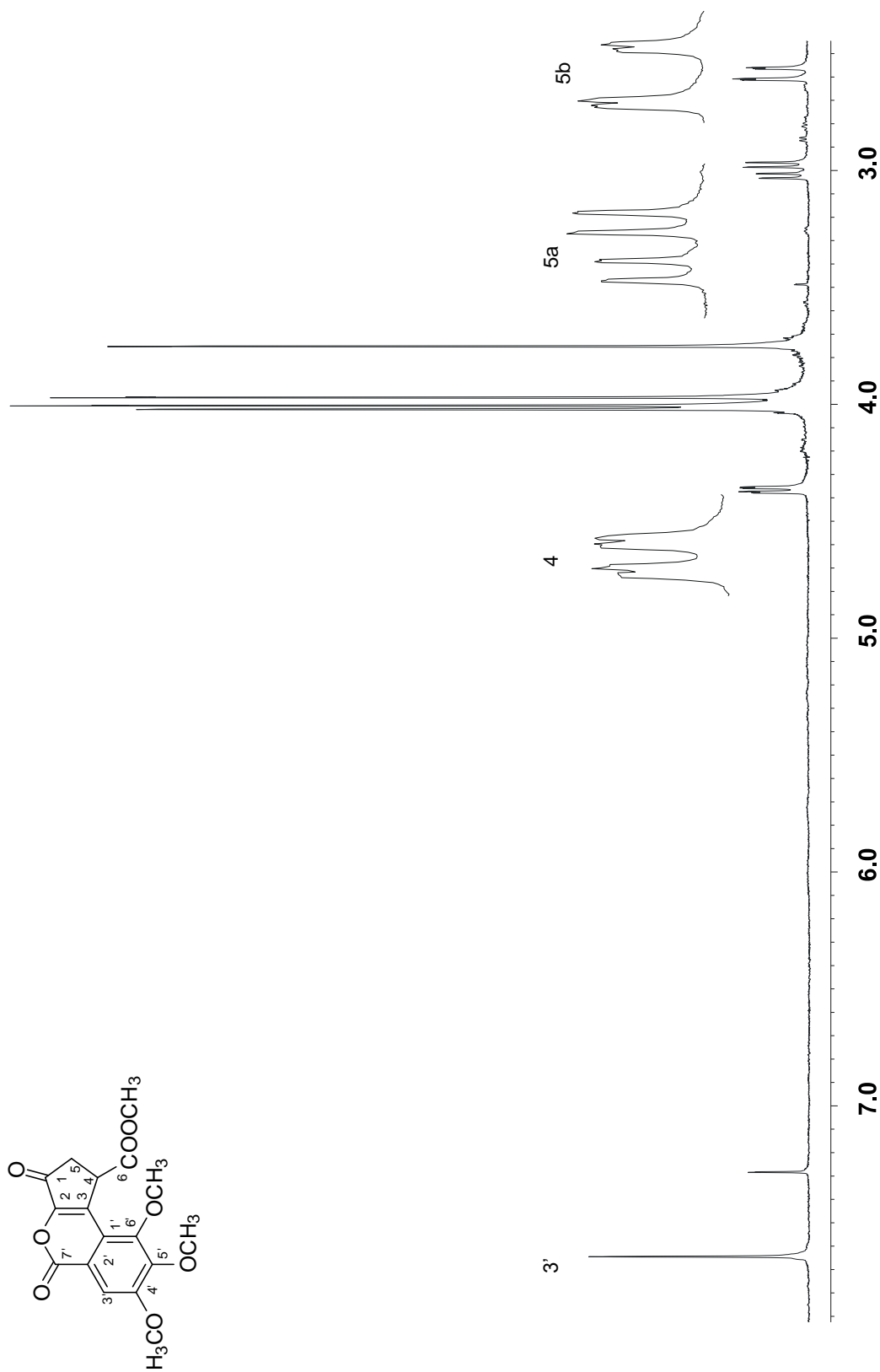


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H de **20** en CDCl_3 a 400 MHz.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. Generalidades

Los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro Perkin Elmer 2000 FT-IR en pastilla de KBr. Las rotaciones ópticas fueron medidas en un polarímetro Perkin Elmer 341. Los espectros de RMN de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz), fueron obtenidos en un espectrómetro Jeol Eclipse 400, usando como disolventes CDCl_3 , CD_3OD , $\text{DMSO}-d_6$ y/o acetona- d_6 . La separación cromatográfica se llevó a cabo en dos soportes: gel sílice y Sephadex LH-20, para el caso del gel de sílice fue de la marca Merck (230-400 mesh ASTM) tamaño de partícula 0.063-0.2 mm en columnas de vidrio de 5.0, 2.0, 1.0, 0.6, 0.4 y 0.2 cm de diámetro interno, para el caso del Sephadex LH-20 se usó una columna cromatográfica de 2.5 cm de diámetro conteniendo 25 gr de soporte. Las cromatografías en capa fina se realizaron en cromatofolios de aluminio recubiertos con gel de sílice 60 F254, espesor de 0.2 mm.

Soluciones reveladoras para CCF: FeCl_3 al 1% en MeOH (**I**), ácido difenilborínico- β -etilaminoéster al 1% en MeOH (**II**), sulfato cérico[IV] amoniacal en solución de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ al 5% (**III**), ácido Fosfomolibdico al 1% en EtOH (**IV**). Soluciones: **I** y **II** para identificar taninos y flavonoides, Soluciones: **III** y **IV** para triterpenos.

G. bellum Rose, *G. potentillaefolium* DC. y *G. seemannii* Peyr. se colectaron en los meses de Junio-Agosto del 2004 en Epazoyucan, Hidalgo. Enviándose una muestra al Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEH cuya identificación botánica fue realizada por el M.C. Manuel González Ledesma, con los siguientes números de depósito (JM Torres-Valencia 59, JM Torres-Valencia

60 y JM Torres-Valencia 61, respectivamente). Las especies se dividieron en parte aérea y raíces, se secaron a la sombra y se obtuvieron los extractos de hexano, AcOEt y MeOH mediante reflujo por 6 h, filtrado y concentrado en el rotavapor. Los extractos de hexano y AcOEt se desengrasaron mediante precipitación con MeOH caliente-frío, filtrado y concentrado en el rotavapor. Para el caso de la parte aérea de *G. seemannii* se obtuvo un extracto adicional de acetona:agua (7:3),

Se utilizaron 0.5 kg de partes aéreas y 0.5 kg de raíces, usando 4 L, de cada disolvente (n-hexano, EtOAc, MeOH y acetona-agua), los rendimientos de los extractos de las raíces de *G. bellum*, n-hexano, EtOAc y MeOH, fueron 3.3, 11.4 y 106.6 g respectivamente, mientras que de sus partes aéreas el rendimiento fue de 2.5, 8.0 y 21.5 g. Así mismo, de *G. potentillafolium* se obtuvo de las raíces 1.4, 6.5, y 26.1 para raíces y 3.4, 7.3 y 27.3 g de partes aéreas.

Para el caso de *Geramiun seemannii*, se utilizaron 0.4 kg de partes aéreas y 0.350 kg de raíces debido a su abundancia, las raíces fueron tratadas de igual manera que las especies anteriores, obteniendo 2.4, 10.5, y 56.1 g, el extracto de las partes aéreas se obtuvo con 4L de acetona:agua (7:3), generando un extracto de 122 g.

8.2. Separación de los extractos de las raíces de las tres especies.

Geranium bellum

Una porción del extracto de *n*-hexano, (1 g) fue combinado con gel de sílice (1 g) y cromatografiado sobre gel de sílice (10 g), *n*-hexano, *n*-hexano-AcOEt (1:0, 9:1, 4:1, 7:3, 3:2, 1:1, 2:3, 3:7, 1:4, 1:9, 0:1) y AcOEt como eluyentes, se colectaron fracciones de 100 mL, marcadas con las letras A-K, fracciones B y C dieron el compuesto **1** (254 mg), mientras que de las fracciones I-J se obtuvo **2** (22mg).

Extracto AcOEt (esquema 1) la adición de H₂O-MeOH (3:2, 150 mL) al extracto (5.5 g) resulto una porción soluble (**parte polar**) 4.5 g y por precipitación una porción insoluble (**parte no polar**) 2.2 g.

Una porción de 2.5 g de la parte polar fue purificada en Sephadex LH-20 (25 g), se colectaron fracciones de 300 mL de mezclas H₂O, H₂O-MeOH y MeOH (1:0, 9:1, 4:1, 7:3, 3:2, 1:1, 2:3, 3:7, 1:4, 1:9), marcadas como A-J, las fracciones B y C dieron **5** (95 mg), de la fracción D se aisló **7** (237 mg), las fracciones E-G proporcionaron 510 mg de **8**.

La parte insoluble denominada no polar se sometió a cromatografía en gel de sílice usando una proporción de 10 g de gel de sílice por 1 g de extracto (absorbido en 1 g de gel de sílice), se uso un lote de 3 g de *G. bellum* usando como eluyente mezclas de Hex, Hex-AcOEt, colectándose fracciones de 7 mL y se usaron 55 mL de cada polaridad, (1:0, 9:1, 4:1, 7:3, 3:2, 1:1, 2:3, 3:7, 1:4, 1:9) las

fracciones fueron seguidas mediante sus perfiles de TLC, se obtuvieron los compuestos **1** 346 mg (fracciones 4-14) y **2** 556 mg (fracciones 75-90) en esta cromatografía.

Los compuestos **3** y **4** se obtuvieron en mezcla 946 mg (fracciones 27-58), por lo que fue necesario hacer reaccionar esta mezcla 500 mg, con un exceso de diazometano, la mezcla resultante se absorbió en 0.5 g de gel de sílice y se colocó en una columna cromatográfica conteniendo 5 g de gel de sílice, impregnado con nitrato de plata en proporción 6:1 (sílice-AgNO₃), usando una mezcla de Hex-AcOEt, 24:1, colectando 25 fracciones de 7 mL, obteniendo los derivados metilados **3a** y **4a** respectivamente (**3a** 13 mg fracciones 3-7 y **4a** 15 mg fracciones 14-18).

El extracto de MeOH permitió la separación de los mismos compuestos hallados en el extracto de acetato de etilo (parte polar), con la diferencia de hallar galato de metilo **6**, en las fracciones B y C de la cromatografía en sephadex, y fue purificado de la misma manera usando proporciones (10:1 w/w de sílice-fracción) y mezclas de CHCl₃, CHCl₃-AcOEt y AcOEt (1:0, 9:1, 4:1, 3:7 1:9, 0:1) 20 mL de cada polaridad, colectando fracciones de 10 mL, aislando 40 mg de **6** (fracciones 3-7), y de las fracciones 8-10 se obtuvo **5** (32 mg). Mientras que **7** (96 mg) y **8** (340 mg) se obtuvieron en las mismas fracciones D y E-G respectivamente.

Geranium potentillaefolium

El extracto *n*-hexánico sometido a las mismas condiciones descritas se obtuvo de **1** (170 mg) y **2** (5 mg) y mientras que el extracto de AcOEt se lograron aislar de la parte no polar **1** (63 mg), **2** (20 mg) además de una mezcla 1:1 de **3** y **4** (485 mg). Y de la parte polar **5** (147 mg) **7** (260 mg) y **8** (690 mg). Del extracto de MeOH **5** (30 mg), **6** (42 mg), **7** (96 mg) y **8** (340).

Geranium seemannii

De esta especie se logro identificar la presencia de **1** y **2** en proporciones muy bajas, y no fue posible aislar compuestos fenólicos y únicamente se logró obtener glucosa mediante la acetilación directa del extracto metanólico, (usando 1 g de extracto en 10 mL de anhídrido acético y 0.5 mL de piridina a reflujo durante 3 h) y su purificación en gel de sílice se obtuvo el derivado penta-acetilado de glucosa como compuesto mayoritario.

8.3. Separación de los extractos de las partes aéreas de *G. bellum* y *G. potentillaefolium*, y extracto de acetona agua de *G. seemannii*.

Geranium bellum

Del extracto de *n*-hexano usando la misma estrategia descrita para las raíces de esta especie, se lograron aislar de **1** (562 mg) y de **2** (15mg).

5.5 g del extracto de AcOEt fue cromatografiado con el mismo procedimiento descrito para el extracto de AcOEt de las raíces, de la parte no polar (0.75 g) se obtuvo **1** (15 mg) y **2** (40 mg), la parte polar (4.2 g) permitió el aislamiento de **5** (75 mg) **7** (200 mg) y **8** (800 mg).

La solubilización diferencial secuenciada en decrementos de polaridad usando acetona y AcOEt permitió la separación gruesa de componentes presentes en el extracto, a 20 g de extracto se le adicionaron 3 X 250 mL de acetona la parte soluble fue concentrada a vacío y se adicionó ahora AcOEt 3 X 250 mL dando por resultado una parte soluble en AcOEt de 5.5 g, un lote de 2.5 g de parte soluble en AcOEt se cromatografiaron en 25 g de Sephadex, se colectaron fracciones de 300 mL de mezclas H₂O, H₂O-MeOH (1:0, 9:1, 4:1, 7:3, 3:2, 1:1, 2:3, 3:7, 1:4, 1:9) y MeOH esta metodología permitió el aislamiento del éster metílico del ácido gálico **6** (32 mg) en la fracción B y C, además del éster metílico del ácido brevifolin carboxílico **11** (15mg) y ácido gálico **5** (180 mg), en la fracción D se identificó coliragina **7** (92 mg), en las fracciones E y F fueron las contenedoras de las mezclas de los flavonoides glicosidados, la fracción G y H contuvo geraniina **8**

(600 mg), por otra parte en la fracción I se logro identificar el flavonoide libre quercetina.

En la separación de flavonoides fracciones E y F (280 mg) se usó una proporción de gel de sílice-fracción 10:1, se colectaron fracciones de 7 mL y las polaridades descritas en la tabla 14.

Tabla 18. Polaridades usadas para separar las mezclas de flavonoides **16-18**

| Fracciones | CHCl ₃ mL | MeOH mL | H ₂ O mL |
|------------|----------------------|---------|---------------------|
| 1-8 | 50 | 7 | 0.6 |
| 9-14 | 48 | 7 | 0.6 |
| 15-19 | 45 | 7 | 0.6 |
| 20-24 | 40 | 7 | 0.6 |
| 25-29 | 35 | 7 | 0.6 |
| 30-35 | 30 | 7 | 0.6 |

Compuesto **16** (10 mg), Fracciones 7-9; compuesto **17** (15 mg), fracciones 11-17; compuesto **18** (23 mg), fracciones 24-30.

Geranium potentillaefolium

Del extracto *n*-hexánico fue posible el aislamiento de **1** (170 mg) y **2** (5 mg); del extracto de AcOEt la parte no polar se obtuvo **1** (70 mg) y **2** (65 mg), de la parte polar **5** (93 mg) **7** (155 mg) y **8** (400 mg) adicionalmente la fracción I se obtuvo una mezcla de **14** (4 mg) y **15** (8 mg). Y el extracto de MeOH, permitió en la fracción B y C el aislamiento de **5** (40 mg), **6** (50 mg) y **11** (15mg) y en la fracción D se identificó coliragina **7** (320 mg), en las fracciones E y F, **17** (15 mg) y **18** (23 mg) la

fracción G y H contuvo geraniina **8** (700 mg), por otra parte en la fracción I se logró identificar **14** (8 mg) y **15** (11 mg).

Geranium seemannii

El extracto *n*-hexánico fue posible el aislamiento de **1** (60 mg). Del extracto de AcOEt de la parte no polar se obtuvo **2** (55 mg), de la parte polar **5** (mg), **9** (mg), **7** (mg). Y del extracto acetona-agua, permitió el aislamiento, **5** (40 mg), **6** (50 mg), **7** (320 mg), **8** (700 mg), **11** (15mg), **14** (8 mg), **15** (11 mg) **16** (mg), **17** (15 mg) y **18** (23 mg).

8.4. Derivados del ácido brevifolin carboxílico 12, 13 y 20.

Para el caso de la obtención de los ésteres metílicos se llevó a cabo el siguiente procedimiento: en dos matraces de 5 L se colocaron 400 g de la parte aérea *Geranium bellum* utilizando 4.5 L de EtOH y 4.5 L de BuOH, a reflujo durante 8 h. Ambos extractos fueron concentrados en rotavapor a presión reducida, los residuos obtenidos fueron sometidos a su separación cromatografía en columnas gel de sílice usando la proporción descrita (10:1) y mezclas de CHCl₃-MeOH, logrando obtener los compuestos **12** y **13**.

Para la obtención del derivado **20** se colocaron en un matraz bola de fondo plano 100 mL, 70 mg de el compuesto **11** en 10 mL de etanol seco y se adicionaron 40 mL de éter conteniendo el diazometano obtenido de 0.5 g de *n*-nitrosometilurea,

se dejó en agitación por 24 h, posteriormente se evaporó el disolvente a presión reducida, el residuo obtenido fue cromatografiado en gel de sílice 60, absorbiendo el crudo de reacción en 0.5 g de gel de sílice y colocándolo en una columna de 7 mm diámetro conteniendo 1 g de gel de sílice, obteniendo eluatos de 4 mL, con Hex-EtOAc de 20:2 a 20:6 de las fracciones 1 a 55, y 1:1 de la 56 a 66, obteniendo 30 mg del compuesto metilado **20**.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Li J. W. H., Vederas J. C. *Science* **2009**, 325, 161-165.
2. Newman D. J., Cragg G. M., Snader K. M. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17, 215–234, a) Kapoor L. D. “CRC Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants” **1990**, CRC Press, Boca Raton, p 1-4
3. Newman D. J. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 2589-2599.
4. Peterson I., Anderson E. A. *Science* **2005**, 310, 451-453.
5. Maynes P., Romero-Galvan J. R. *Destiempos* **2009**, 18, 42-50.
6. Rishton G. M. *Am. J. Card.* **2008**, 101, 22. a) Fisch C., William W. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1985**, 5, 1A–2A.
7. Smith S. *J. Chem. Soc.* **1930**, 508–510.
8. Norgardy T., Weaver D. F. “Medicinal Chemistry *A Molecular and Biochemical Approach*” **2005**, 3ra Ed, Inglaterra, Oxford University Press, p 138.
9. Nicolau K. C., Montagnon T. MOLECULES THAT CHANGED THE WORLD **2008**, 1ª Ed, Wiley- VCH, Alemania, p 68-78.
10. Sanghi S., MacLaughlin E. J., Jewell C. W., Chaffer S., Naus P. J., Watson L. E., Dostal D. E. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug, Targ.* **2006**, 6, 85–100
11. Nicolau K. C., Montagnon T. MOLECULES THAT CHANGED THE WORLD **2008**, 1ª Ed, Wiley- VCH, Alemania, p 22-27.
12. Butler M. S. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, 22, 162 – 195
13. Drews J. *Science* **2000**, 287, 1960-1964.
14. Wang Y. *Pain* **2000**, 84, 271-281 a) Dalisay D. S., Livens S. L., Saludes J. P., Molinski T. F., *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2008**, 7, 27.
15. Norgardy T., Weaver D. F. “Medicinal Chemistry *A Molecular and Biochemical Approach*” **2005**, 3ra Ed, Inglaterra, Oxford University Press, p 108-161 a) Mullin R. *Chem Eng News* **2005**, 83, Special Issue 25, The Top Pharmaceuticals that Change World. b) Jacoby M. *Chem Eng News* **2005**, 83, Special Issue 25, The Top Pharmaceuticals that Change World. c) Class S. *Chem Eng News* **2005**, 83, 15-32

16. Weissman K. J., Leadlay P. F. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2005**, 3, 925.
17. Rollinger J. M. *Phytochemistry Lett.* **2009**, 2, 53-58
18. Drahl C. *Chem. Eng. News.* **2009**, 87, 32-35 a) Nett M., Moore B. S. *Pure Appl. Chem.* **2009**, 81, 1075-1084.
19. Drahl C., *Chem. Eng. News.* **2009**, 87(39), 13. a) Arnaud C. *Chem. Eng. News* **2009**, 87(15), 44.
20. Paul M Dewick “Medicinal Natural Products a Biosynthetic Approach” **2002**, Ed. John Wiley & Sons, Inglaterra, Pag 13-15.
21. Canell R. J. P. “Natural Products Isolation” **1998**, Ed Humana Press, Totowa New Jersey, Pag 1-2.
22. Crozier A., Jaganathb I. B., Clifford M. N. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26, 1001–1043.
23. Piao M. J, Kanga K. H., Zhanga R., Koa D. O., Wanga Z. H., Leea K. H., Changa W. Y., Chaeb S., Jeec S., Shinc T., Parkd J. W., Lee N. H., Hyun J. W. *Food Chem.* **2009**, 115, 412-418.
24. Grotewold E. “The Science of Flavonoids” **2006**, Ed Springer, NY USA, pag 15-45.
25. Hertog M. G. L., Hollman P. C. H., Katan M. B., *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 2379–2383
26. Gayosso-De-Lucio J. A. “Compuestos antioxidantes de *Geranium bellum* Rose” Tesis de Maestría, Área Académica de Química; ICBI, UAEH, enero **2007**, Hidalgo México.
27. Amabeoku G.J. *J. Ethnopharm.* **2009**, 123, 190-193.
28. Jae-Uoong S., Phil-Sun O., Kye-Taek L. *J. Ethnopharm.*, **2009**, 126, 90-95
a) Jae-Uoong S., Kye-Taek L. *Environment. Tox. and Pharm.* **2008**, 26, 320-324.
29. Amaral S., Mira L., Nogueira J. M. F., Pereira A. S., Florêncio M. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 1876-1883.
30. Nikitina V. S., Kuz'mina L. Y., Melent'ev A. I., Shendel G. V. *Appl. Biochem. Microb.* **2007**, 43, 629–634.

31. Küpeli E., Tatli I. I., Akdemir Z. S., Yesilada E. *J. Ethnopharm.* **2007**, *114*, 234-240.
32. Atsushi O., Syuntaro H., Shinji K., Tetsuya T., Yoshiharu Y., Masahiro N., Hiroshi A. *Weed Biology. & Managment* **2009**, *9*, 169-172.
33. Jiyang L., Hai H., Meiqing F., Wei Z., Xunlong S., Pei Z. *Antiviral Res.* **2008**, *79*, 114-120.
34. Calzada F., Yépez-Mulia L., Tapia-Contreras A. *J. Ethnopharm.* **2007**, *113*, 248-251.
35. Huang G. D, You Y., Huang Y.H., Tang L. J., Yang Z. F., Xu L., Huang D.F., Xiao M. Z. *Zhong Yao Cai.* **2009**, *32*, 97-09.
36. Ryu B. H. *J. Life Sci;* **2004**, *14*, 180-187.
37. Quing-He L., Ji-Eung J., Eun J. C., Young H. M., Eun-Rhan W. *Arch Pharm Res.* **2006**, *29*, 1109-1113.
38. Akdemir Z. S., Tatli J. J., Saracoglu J., Ismailoglu U. B., Sahin-Erdemli I., Calis I., *Phytochemistry.* **2001**, *56*, 189-193.
39. Ercil D., Kaloga M., Ratke O. A., Sakar M. K., Kiderlen F.A., Kolodziej H. *Turk J. Chem.* **2005**, *29*, 437-443.
40. Calzada F., Meckes M., Cedillo-Rivera R., Tapia-Contreras A., Mata R. *Pharmaceutical Biology* **1998**, *36*, 305-309 a) Calzada F., García-Rojas C. M., Meches M., Rivera C. R., Bye R., Mata R. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 705-709.
41. Camacho-Luis, A., Gayosso-de-Lucio J. A., Torres-Valencia J. M., Muñoz-Sánchez J. L., Alarcón-Hernández E., López R., Barrón B. *J. Mex. Chem. Soc.*, **2008**, *52*, 103-107.
42. Tay Z. J., Velasco C. O., Lara A. R., Gutiérrez Q. M. "Parasitología Medica" **2002**, Séptima Edición, México, 123-146. a) Cavalli A., Bolognesi A. L. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7339-7359.
43. Quiroz R. H. "Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos" **1984**, Primera Edición, México, 69-86.
44. Cercetto H., González M., *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**; *2*, 1215-1237.

45. Holloway G. A., Charman W. N., Fairlamb A. H., Brun R., Kaiser M., Kotewicz E., Novello P. M., Parisot J. P., Richardson J., Street I. P., Watson K. G., Baell J. B. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**, *53*, 2824-2833.
46. Perez-Pineiro R., Burgos A., Jones D. C., Andrew L. C., Rodríguez H., Suárez M., Fairlamb A. H., Wishart D. S. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1670-1680 a) Lalmanach G, Mayer R, Serveau C, Scharfstein J, Gauthier F. *Biochem J.* **1996**, *318*, 395-399 b) Roush W. R, Hernandez A. A., McKerrow J. H., Selzer P.M., Hansell E., Engel J. C. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9747-9762.
47. Lakhdar-Ghazal F., Blonski C., Willson M., Michels P., Perie, J. *Curr. Top. Med Chem.* **2002**, *2*, 439-456. a) Mott B.T., Ferreira R. S., Simenov A., Kean-Hooi K., William L., Shen M., Silveira T., Doyle P. S., Arkin M. R., McKerrow J. H., Inglese J., Austin C. P., Thomas C. J., Shoichet B. K., Maloney D. J. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 52-60. b) Brak K., Doyle P. S., McKerrow J. H., Ellman J. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 6404-6410
48. Rassi A, Luquetti, A. O., Rassi A. Jr., Rassi G. G., Rassi S. G., Da Silva I. G. Rassi A. G. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *76*, 58–61. a) Gonzalez–Martin G., Figueroa C., Merino I., Osuna A., *Eur J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *49*, 137 b) Guedes P. M. M., Fietto J. L. R., Lana M., Bahia M. T. *Anti-infective Agents in Medicinal Chemistry* **2006**, *5*, 175-186.
49. Gómez-Puyou A., Saavedra-Lira E., Becker I., Zubillaga R. A., Rojo-Dominguez A., Pérez-montfort R. *Chem Biol* **1995**, *2*, 847-855
50. Velanker S.S., Ray S. S., Gokhale R. S., Balaram H., Balaram P., Murthy M. R. N. *Structure* **1997**, *5*, 751-761
51. Tellez-Valencia A., Ávila-Rios S., Pérez-Montfort R., Rodríguez-Romero A., Gómez-Puyou M. T., López-Calahorra F., Gómez-Puyou A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *295*, 958
52. Olivares-Iliana V., Rodríguez-Romero A., Becker I., Berzunza M., García J., Pérez-Montfort R., Cabrera N., López-Calahorra F., Gomez-Poyou M. T., Gómez-Poyou A. *Plos Neglected Tropical Diseases*, **2007**, *1*, 1-8.

53. Senkovich O., Bhatia V., Garg N., Chattopadhyay D. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2005**, *49*, 3234-3238.
54. Braga M. V., Urbina J. A., DeSouza W. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2004**, *24*, 72
55. Urbina J. A., Concepcion J. L., Caldera A., Payares G., *Antimicrob. Agents. Chemoter.* **2004**, *48*, 2379
56. Liendo A., Lazard K., Urbina J. A. *J. Antimicrob. Chemoter.* **1998**, *41*, 197.
57. Lepesheva G. I., Hargrove T. Y., Kleshchenko Y., Nes W. N., Villata F. Waterman M. R. *Lipids*, **2008**, *43*, 1117-1125.
58. Kraus J. M., Verlinde C. L. M. J., Kirimi M., Lepesheva G. I., Gelb M. H., Bunker F. S. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1639-1647.
59. Konkle M. E., Hargrove T. Y., Kleshchenko Y. Y., Kries P. V., Ridenour W., Uddin M. J., Caprioli R., Marnet L. J. Nes D. W., Villata F., Waterman R. M. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2846-2853
60. Okuda T., Yoshida T., Hatano T. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 1-31.
61. Paveto C., Guida MC., Esteva MI., Martino V., Coussio J., Flawia MM., *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**; *48*, 69-74.
62. Calzada F., Cervantes-Martínez J. A., Yépez-Muliab L. *J. Ethnopharm.* **2005**, *98*, 191-193.
63. Pérez-Escandón B. E., Villavicencio M. A. "Ramírez Aguirre A. Lista Florística del Estado de Hidalgo Recopilación Bibliográfica" **1998**, 1ª edición, Ed. UAEH. México.
64. Mujumder P. L., Maiti D. C., Kraus W. *Phytochemistry*, **1987**, *26*, 3021-3025. a) Chen B., Duan H., Takaishi Y. *Phytochemistry*, **1999**, *51*, 683-687.
65. Yoshida T., Okuda T. *Heterocycles*, **1980**, *14*, 1743-1749.
66. Gutzeit D., Wray V., Winterhalter P., Jerz G. *Chromatographia*, **2007**, *65*, 1-7.
67. Yoshida T., Itoh H., Matsunaga S. TanaKa R., Okuda T. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 53-60.
68. Kim H. J., Woo E. Park H. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 581-86.

69. Braca A., Politi M., Sanogo R., Sanou H., Morelli I., Pizza C., De Tommasi N. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6689-6695.
70. Tanaka T., Fujisaki H., Nonaka G., Nishioka I. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 2937-2944.
71. Okuda T., Yohishida T., Nayeshiro H. *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 1862-1869.
72. Schmidt O. Th., Wurmb R., Schulz J., *Liebigs Ann. Chem.* **1967**, *706*, 180-186.
73. Guo J. S., Wang S. X., Li X., Zhu T. R. *Acta Pharm. Sin.* **1987**, *22*, 28-32.
74. Takashi T., Nonaka G., Nishioka I. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 2424-2428.
75. Yao Q. Q., Zuo C. X. *Acta Pharm. Sin.* **1993**, *28*, 829-835.