



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA**

**Investigación de la Flora Terapéutica del
Municipio de Acaxochitlán y
Estudio Químico de *Geranium bellum*,
Geranium seemanii y *Geranium potentillaefolium***

Tesis que para obtener el
Título de Licenciado en Química

P R E S E N T A:

NANCY AGUILAR LÓPEZ

ASESORES

**Dr. J. Martín Torres Valencia
M. en Q. Juan Antonio Gayosso De Lucio**

La primera sección de esta tesis formó parte de un proyecto multidisciplinario regional SEP-CONACYT denominado "*Plan estratégico para detonar el desarrollo económico-social del municipio de Acaxochitlán*", referencia: FOMIX-HGO 2007-C01-73636.

La segunda parte dentro de la investigación planteada en el proyecto denominado "*Búsqueda de nuevos principios activos naturales y sintéticos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas*", referencia PAI 2006 B-50. Este trabajo se llevó a cabo en el Área Académica de Química, en el Instituto de Ciencias Básicas e Ingenierías, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. J. Martín Torres Valencia y del M. en Q. Juan Antonio Gayosso De Lucio.

Este trabajo se presentó en la 5ª Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica, llevada a cabo en Zacatecas, Zacatecas los días 27 y 28 de mayo de 2009, con el título "*Taninos y flavonoides de *Geranium potentillaefolium**", memorias del evento, cartel No. 80.

INDICE

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

- PARTE 1 1
- PARTE 2 2

MARCO TEÓRICO

- Metabolitos primarios y secundarios 6
- Flavonoides y taninos 7

PARTE 1 12

1.1 ANTECEDENTES 13

1.2 OBJETIVO 15

1.3 RESULTADOS 16

- Santa Cecilia 17
- Chimalapa 26
- Santa Catarina 32

1.4 CONCLUSIONES 33

PARTE 2 34

2.1 ANTECEDENTES 35

- Descripción y caracterización de *Geranium* 35
- Actividad biológica y compuestos químicos de especies de *Geranium* 37

2.2 JUSTIFICACIÓN 41

2.3 OBJETIVOS 42

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 43

- Extractos hexánicos de las raíces y parte aérea de *Geranium bellum*, *Geranium seemannii* y *Geranium potentillaefolium*. 43
- Extracto de acetato de etilo de la parte aérea de *Geranium potentillaefolium* 50

2.5 CONCLUSIONES 69

2.6 PARTE EXPERIMENTAL 71

- Colecta de especies y obtención de extractos	72
- Separación del extracto hexánico de las raíces de <i>Geranium bellum</i>	73
- Separación del extracto hexánico de la parte aérea de <i>Geranium bellum</i>	77
- Separación del extracto hexánico de las raíces de <i>Geranium seemannii</i>	79
- Separación del extracto hexánico de la parte aérea de <i>Geranium seemannii</i>	81
- Comparación mediante cromatografía en capa fina de los extractos hexánicos de las raíces de las tres especies de <i>Geranium</i>	83
- Separación del extracto de acetato de etilo de la parte aérea de <i>Geranium potentillaefolium</i>	84
- Fracción polar	84
- Hidrólisis de geraniina	87
- Fracción no polar	90

REFERENCIAS

92

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
Acetona- d_6	Acetona deuterada
cm	Centímetros
CC	Columna cromatográfica
J	Constante de acoplamiento
CCF	Cromatografía en capa fina
MASA	Cromatógrafo de gases acoplado a masas
δ	Desplazamiento químico
DMSO- d_6	Dimetil sulfóxido deuterado
GbR	<i>Geranium bellum</i> Rose
Gp	<i>Geranium potentillaefolium</i>
Gs	<i>Geranium seemannii</i>
g	Gramos
Hz	Hertz
Hex	Hexano
h	Horas
Kg	Kilogramos
Km	Kilómetros
MeOH	Metanol, alcohol metílico
mg	Miligramos
mL	Mililitros
ppm	Partes por millón
Piridina- d_5	Piridina deuterada
RMN	Resonancia magnética nuclear
^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono
^1H	Resonancia magnética nuclear de protón

GRACIAS

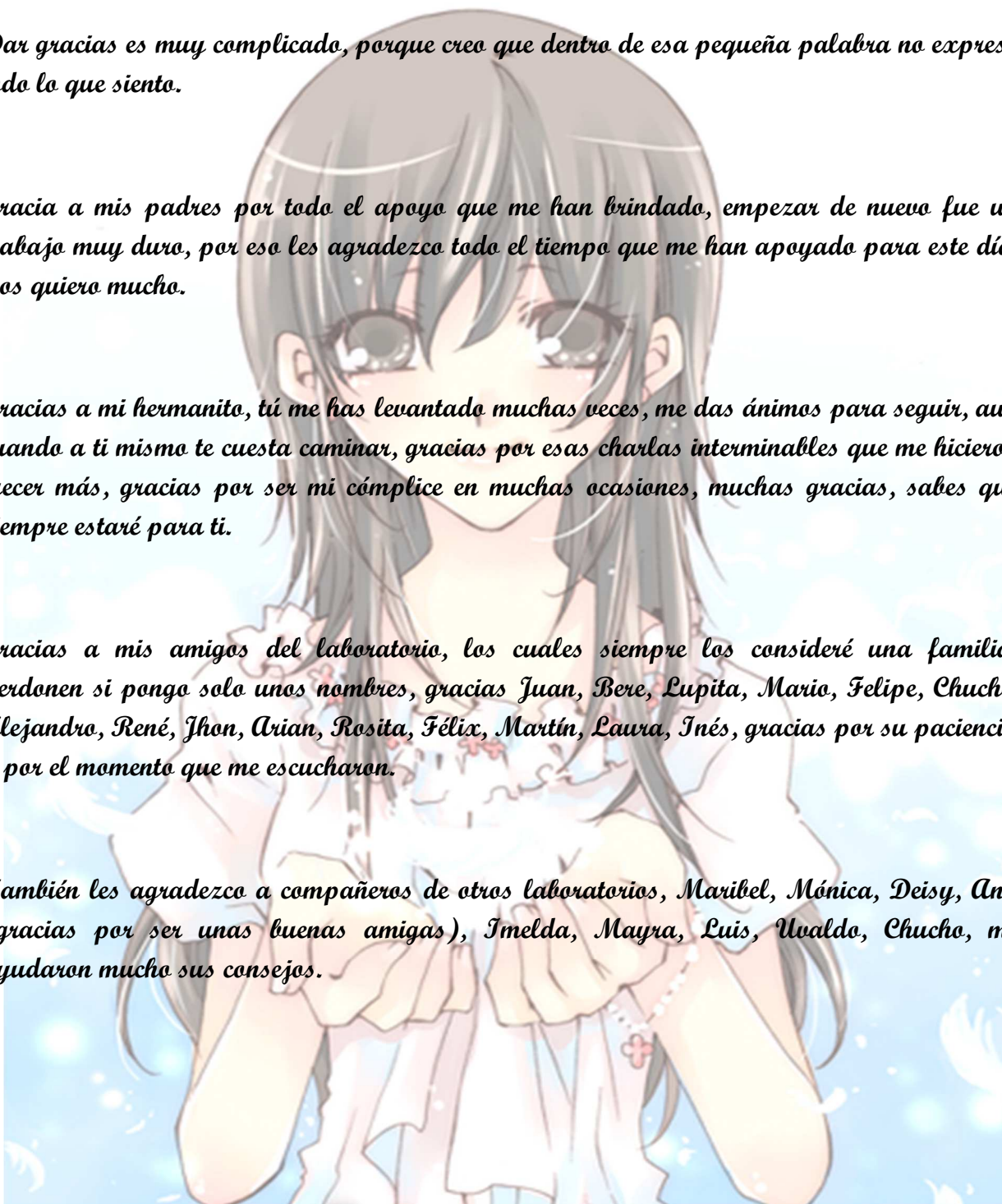
Dar gracias es muy complicado, porque creo que dentro de esa pequeña palabra no expreso todo lo que siento.

Gracia a mis padres por todo el apoyo que me han brindado, empezar de nuevo fue un trabajo muy duro, por eso les agradezco todo el tiempo que me han apoyado para este día. Los quiero mucho.

Gracias a mi hermanito, tú me has levantado muchas veces, me das ánimos para seguir, aun cuando a ti mismo te cuesta caminar, gracias por esas charlas interminables que me hicieron crecer más, gracias por ser mi cómplice en muchas ocasiones, muchas gracias, sabes que siempre estaré para ti.

Gracias a mis amigos del laboratorio, los cuales siempre los consideré una familia, perdonen si pongo solo unos nombres, gracias Juan, Bere, Lupita, Mario, Felipe, Chucho, Alejandro, René, Jhon, Arian, Rosita, Félix, Martín, Laura, Inés, gracias por su paciencia y por el momento que me escucharon.

También les agradezco a compañeros de otros laboratorios, Maribel, Mónica, Deisy, Ana (gracias por ser unas buenas amigas), Imelda, Mayra, Luis, Uvaldo, Chucho, me ayudaron mucho sus consejos.

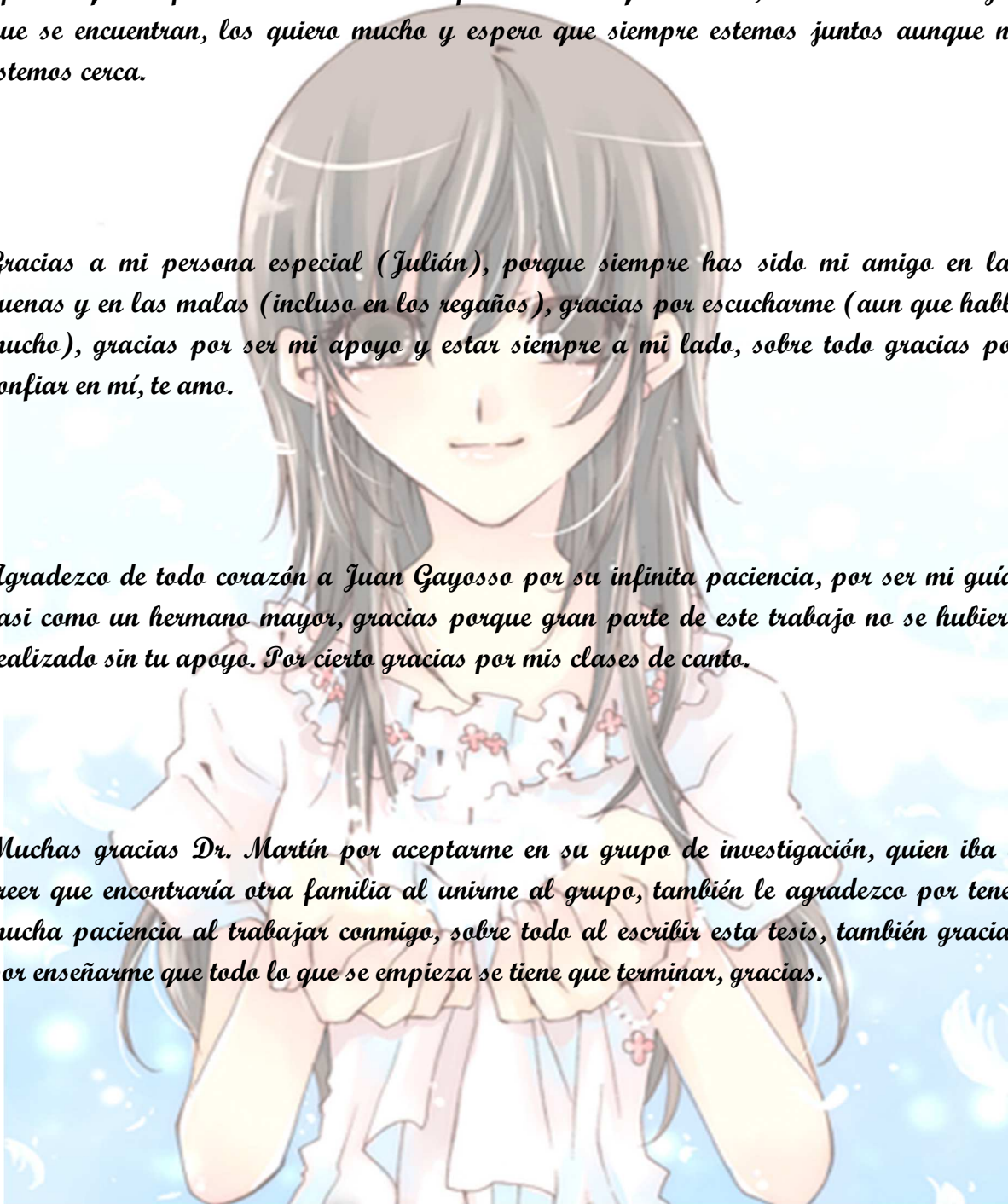


Gracias a Gina, Homero y Jonás, por ser unos hermanos increíbles, los quiero mucho aprendí que la familia no solo son los parientes con que se nace, también a los amigos que se encuentran, los quiero mucho y espero que siempre estemos juntos aunque no estemos cerca.

Gracias a mi persona especial (Julián), porque siempre has sido mi amigo en las buenas y en las malas (incluso en los regaños), gracias por escucharme (aun que hable mucho), gracias por ser mi apoyo y estar siempre a mi lado, sobre todo gracias por confiar en mí, te amo.

Agradezco de todo corazón a Juan Gayosso por su infinita paciencia, por ser mi guía, casi como un hermano mayor, gracias porque gran parte de este trabajo no se hubiera realizado sin tu apoyo. Por cierto gracias por mis clases de canto.

Muchas gracias Dr. Martín por aceptarme en su grupo de investigación, quien iba a creer que encontraría otra familia al unirme al grupo, también le agradezco por tener mucha paciencia al trabajar conmigo, sobre todo al escribir esta tesis, también gracias por enseñarme que todo lo que se empieza se tiene que terminar, gracias.



INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se conformó por 2 partes.

PARTE 1

El objetivo principal de este proyecto es el llevar a cabo estudios tendientes a encontrar áreas de oportunidad en donde los habitantes del municipio pudieran obtener un beneficio social y económico para mejorar su calidad de vida. Una de estas áreas es la posible utilización y comercialización de plantas medicinales del municipio, para lo cual primero había que realizar una investigación sobre su flora terapéutica. Esto traería como finalidad el plantear posteriormente proyectos productivos para la localidad. Precisamente, esta parte de trabajo representa la investigación inicial sobre las especies medicinales identificadas hasta la fecha de la escritura de esta tesis.

En dicho proyecto se otorgó una beca de licenciatura que contribuyó al desarrollo del presente trabajo de investigación y que comprendió salidas de campo para el reconocimiento de plantas medicinales del municipio, entrevistas verbales con los habitantes de las localidades visitadas para información del uso medicinal de las plantas, la colecta de especies para su identificación botánica y la revisión bibliográfica de los estudios químicos y biológicos que se han descrito sobre las plantas identificadas.

En esta sección se incluyen las imágenes de las especies, los usos tradicionales y las estructuras de los metabolitos encontrados en éstas, así como sus propiedades biológicas conocidas. Derivado de esta investigación inicial, se da una recomendación de cuales especies pudieran ser utilizadas con fines comerciales por los habitantes del municipio.

PARTE 2

En esta parte se presentan los resultados del estudio químico llevado a cabo sobre los extractos hexánicos de las raíces de tres especies de *Geranium*: *G. bellum*, *G. seemannii* y *G. potentillaefolium*. También se presenta el estudio del extracto de acetato de etilo de la parte aérea de la última especie. La investigación comprendió la colecta de las especies, su identificación botánica, la obtención de los extractos, la separación de los mismos mediante técnicas cromatográficas y la caracterización de las sustancias obtenidas mediante métodos espectroscópicos, así como por comparación con muestras auténticas y datos descritos.

En esta parte se describe de manera general las plantas de *Geranium*, su distribución geográfica dentro del estado de Hidalgo, los usos medicinales atribuidos, los antecedentes de estudios químicos y biológicos, la metodología llevada a cabo para su estudio químico y las evidencias espectroscópicas que llevaron a la caracterización de las sustancias, así como la bibliografía utilizada.

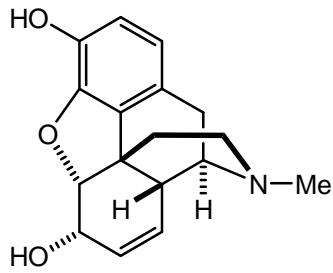
Antes de la descripción de los antecedentes y los resultados de cada una de estas partes, a continuación se da un marco teórico general para ambos apartados.

MARCO TEÓRICO

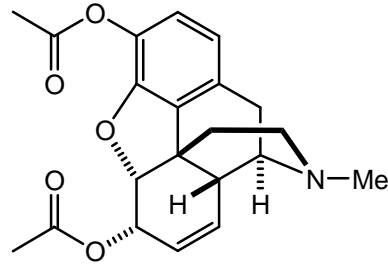
El uso de las plantas con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad. El hombre recurría a la naturaleza en busca de su alimento y de su salud. Este conocimiento fue transmitido de generación en generación y fue incrementándose con el tiempo. Tres siglos antes de Cristo fue escrito el libro más antiguo de plantas medicinales en China, mientras que los sumerios usaban las plantas con fines curativos 2500 años A.C., asimismo, los asirios conocían poco más de 250 plantas medicinales y en la antigua Grecia se usaban, entre otras, la canela, el ruibarbo, la genciana y la mostaza. Alejandro Magno, de sus expediciones por África, Persia y la India, introdujo en Europa un sin número de plantas con propiedades curativas.¹

A lo largo del tiempo, los avances tecnológicos han generado medicamentos que en muchos aspectos han ido sustituyendo esa antigua forma de curación. Sin embargo, las plantas medicinales no han perdido importancia. Algunos medicamentos modernos han resultado de aprovechar las plantas medicinales y del desarrollo de nuevos medicamentos, que siguen dependiendo en gran parte de esta materia prima.²

Muchas plantas medicinales contienen compuestos con gran impacto fisiológico, los cuales son considerados como principios activos y en varios casos se han logrado aislar y caracterizar. Por ejemplo, en 1816 se obtuvo la **morfina** de *Papaver somniferum* (opio),³ y es considerado como el primer alcaloide aislado, el cual es un potente analgésico. La morfina ha servido como base para el desarrollo de otros fármacos con mayor potencia analgésica como la **heroína**, aunque presentan la desventaja de generar dependencia física.

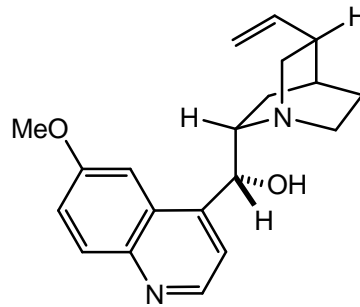


morfina

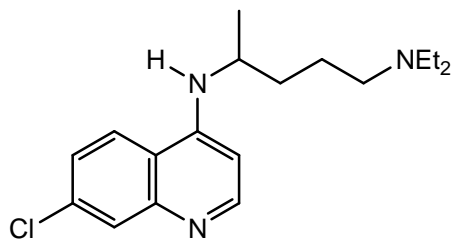


heroína

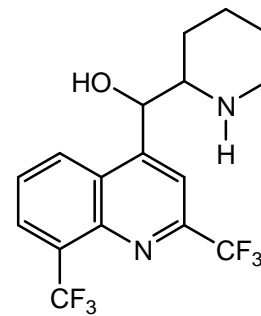
Unos años más tarde, en 1820, fue aislada la **quinina** de la corteza de las especies de *Cinchona*, hecho que reportado por los farmacéuticos franceses Caventou y Pelletier,⁴ y que fue útil para el tratamiento de la malaria. La quinina sirvió de base para la síntesis de fármacos empleados habitualmente, como la **cloroquina** y la **mefloquina**, aunque luego el agente de la malaria (*Plasmodium falciparum*) desarrolló resistencia.⁴



quinina

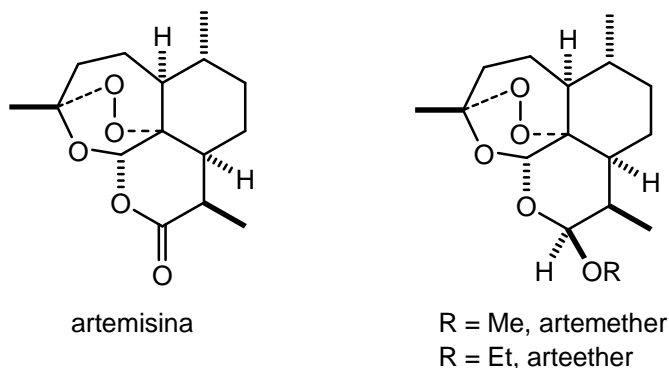


cloroquina

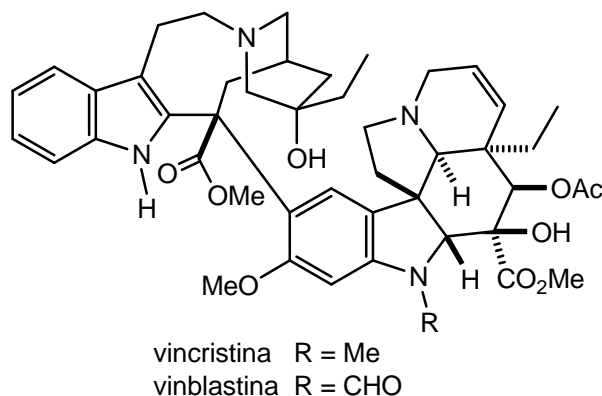


mefloquina

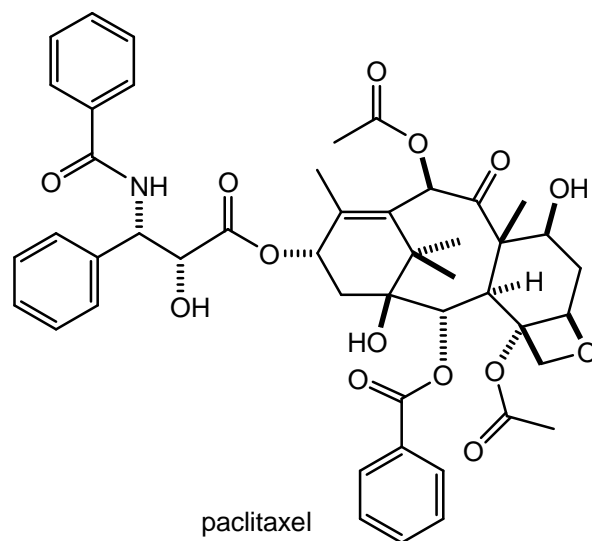
Otro ejemplo lo representa la **artemisinina**, principio antimalárico que se obtiene de la planta *Artemisia annua* (Quinchaosu), una especie medicinal de China empleada para el tratamiento de fiebre. También este compuesto ha servido como modelo para la obtención de derivados como el **artemether** y **arteether**, que resultaron ser eficaces para las cepas resistentes de la malaria.⁴



Varias plantas tienen historia en el tratamiento del cáncer, aunque existen controversias debido a su eficacia y escepticismo hacia el tratamiento. Entre los medicamentos de uso clínico más conocidos son los alcaloides de la vinca,⁴ los cuales fueron introducidos en 1960 y tienen propiedades antitumorales e inmunosupresores. Se han aislado de la vinca de Madagascar (*Catharanthus roseus*), siendo los metabolitos principales **vincristina** y **vinblastina**, que inhiben la polimerización de la tubulina, una proteína involucrada en la mitosis celular. Se ha demostrado la eficacia de la vincristina en las leucemias linfoblásticas agudas de los niños y en el cáncer de mama.⁵



Un ejemplo más es el pseudoalcaloide diterpénico **paclitaxel**, conocido comercialmente como Taxol[®], que se aísla de la corteza de *Taxus brevifolia* (tejo del Pacífico), una especie que crece en los Estados Unidos y Canadá. En 1983 dio inicio el tratamiento para humanos con este compuesto y en la actualidad se usa para el cáncer de ovario, mama y tumores de cabeza, cuello, pulmón, próstata y estómago.^{5,6}



Metabolitos primarios y secundarios

Las sustancias mostradas en los párrafos anteriores constituyen ejemplos de metabolitos secundarios a los cuales usualmente se les denomina productos naturales. Este término realmente comprende tanto a los metabolitos secundarios como a los primarios, cuya clasificación se debe principalmente a la función que desempeñan dentro del organismo que los produce. Si el metabolito desempeña una función vital se le cataloga como primario. Ejemplos de éstos son los polisacáridos, las proteínas, los ácidos nucleicos y las grasas. Por el contrario, si el metabolito no participa en funciones vitales se le clasifica como secundario, como por ejemplo terpenos, alcaloides, policétidos, cumarinas, flavonoides y taninos.

Los metabolitos primarios son compuestos que se producen en la mayoría de los seres vivos y desempeñan un papel central en el metabolismo y la reproducción de las células, mientras que los metabolitos secundarios se encuentran sólo en organismos específicos, o grupos de organismos, y son una expresión de la individualidad de la especie. Algunos son materiales tóxicos de defensa contra depredadores, otros funcionan como atrayentes volátiles de insectos, como colorantes o para avisar a otras especies. Los metabolitos secundarios han despertado el interés debido a su efecto biológico en otros organismos, y en varios casos poseen actividades biológicas relevantes y específicas. Por esta razón se han estudiado de manera intensiva.⁷

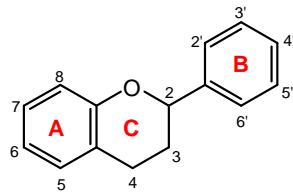
Flavonoides y Taninos

Los **flavonoides** representan un grupo significativo de metabolitos secundarios con importantes actividades biológicas, destacando la actividad antioxidante y antiinflamatoria, entre otras. Son compuestos ampliamente distribuidos entre los vegetales y se encuentran prácticamente en todas las plantas, sobre todo en las partes aéreas: hojas, flores y frutos. Algunos flavonoides son responsables del color amarillo de ciertas flores.⁸

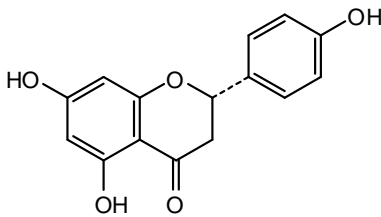
Se ha reportado que las especies que contienen flavonoides poseen actividad terapéutica como antihemorrágicos, antiarrítmicos, antiinflamatorios, antioxidantes, antihepatotóxicos, diuréticos, antibacterianos y antiespasmódicos.⁸ Tienen estructuras del tipo $C_6-C_3-C_6$, con dos anillos aromáticos unidos entre sí por una cadena de tres carbonos cíclica o acíclica a través de un átomo de oxígeno. Todos los flavonoides contienen un carbonilo en la posición 4 y las variaciones se producen en las posiciones 1, 2 y 3 de la unidad C_3 y en el anillo B. En varios casos se aíslan en forma libre o como glicósidos, siendo la glucosa el azúcar más frecuente.⁸

Los flavonoides se clasifican de acuerdo a sus variaciones estructurales. A continuación se muestran el esqueleto base y las principales diferencias estructurales, así como ejemplos típicos de este tipo de metabolitos secundarios.

Esqueleto base

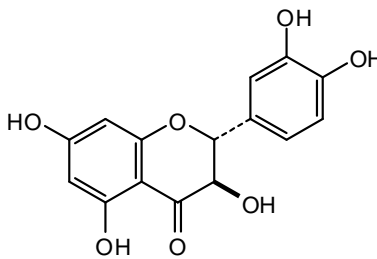


Flavanonas



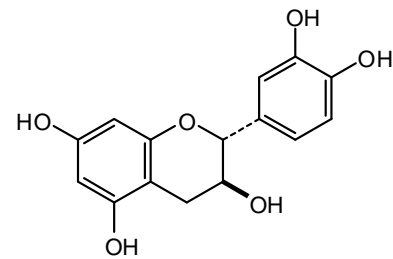
naringenina

Dihydroflavonoles



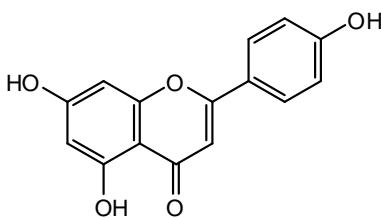
dihidroquercetina

Catequinas



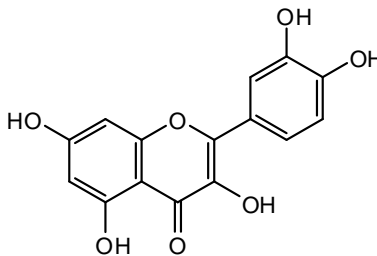
(+)-catequina

Flavonas



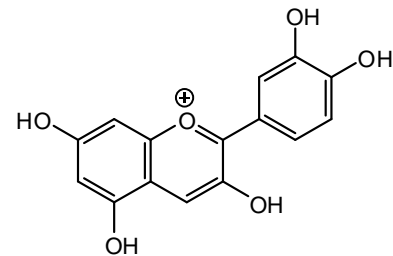
apigenina

Flavonoles



quercetina

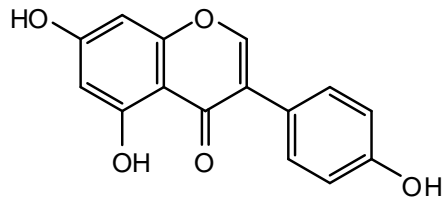
Antocianidinas



cianidina

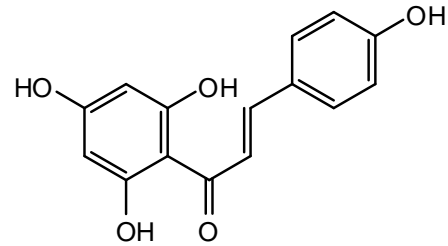
Existen en la naturaleza otras sustancias con estructuras relacionadas con las anteriores, las cuales son menos abundantes y se denominan isoflavonoides, chalconas y auronas. Las chalconas son consideradas como precursoras de los flavonoides.

Isoflavonoide



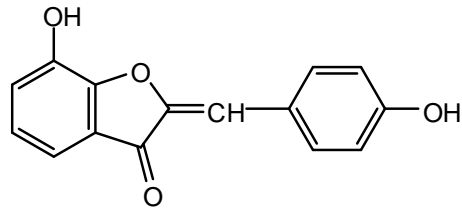
genisteína

Chalcona



naringenin-chalcona

Aurona



4',7-dihidroxi aurona

Por su parte los **taninos** están constituidos por un amplio grupo de compuestos hidrolizables con estructura polifenólica, los cuales son capaces de precipitar ciertas moléculas (proteínas, alcaloides, celulosa, gelatina). Estas propiedades condicionan su uso.⁸

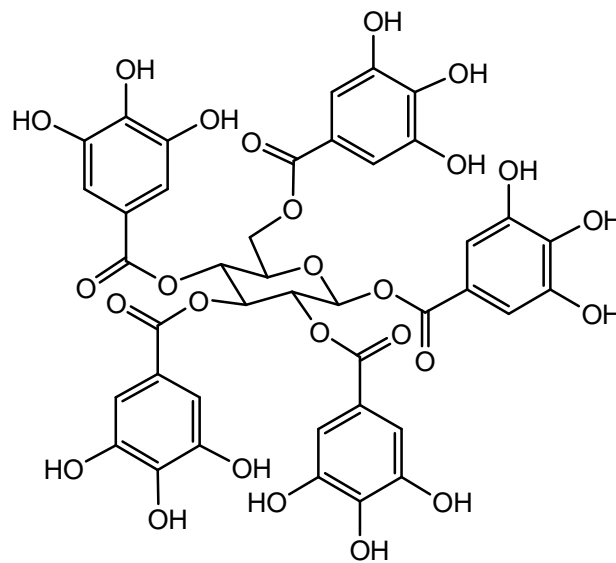
Los principales usos terapéuticos de este tipo de compuestos son: antidiarreicos, cicatrizantes, hemostáticos, antihemorrágicos, antisépticos, antioxidantes, antídotos de metales e hipocolesterolémicos.⁸

Algunas propiedades que los caracterizan son:

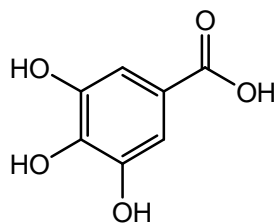
- * Sólidos amorfos.
- * Solubles en agua.
- * Solubles en disolventes orgánicos polares.
- * Forman quelatos con los metales pesados.
- * Se oxidan con facilidad.
- * Reducen diversos compuestos.

Los taninos se dividen en dos grandes grupos: taninos hidrolizables y taninos condensados (también denominados taninos catequicos o proantocianidinas).⁸

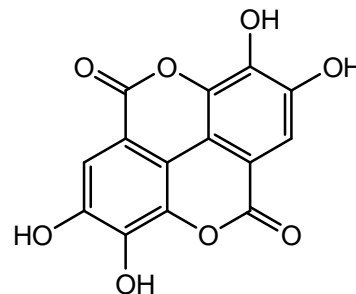
✳ **Taninos hidrolizables:** son ésteres formados por una molécula de azúcar (generalmente glucosa) unida a un número variable de moléculas de ácidos fenólicos, como por ejemplo la **pentagaloilglucosa**. Los ácidos fenólicos son usualmente el ácido **gálico** o su dímero el ácido **elágico**. Se hidrolizan tanto en medio ácido o básico como por hidrólisis enzimática. Al tratar los taninos hidrolizables con cloruro férrico (FeCl_3) aparece una coloración azul.⁸



pentagaloilglucosa

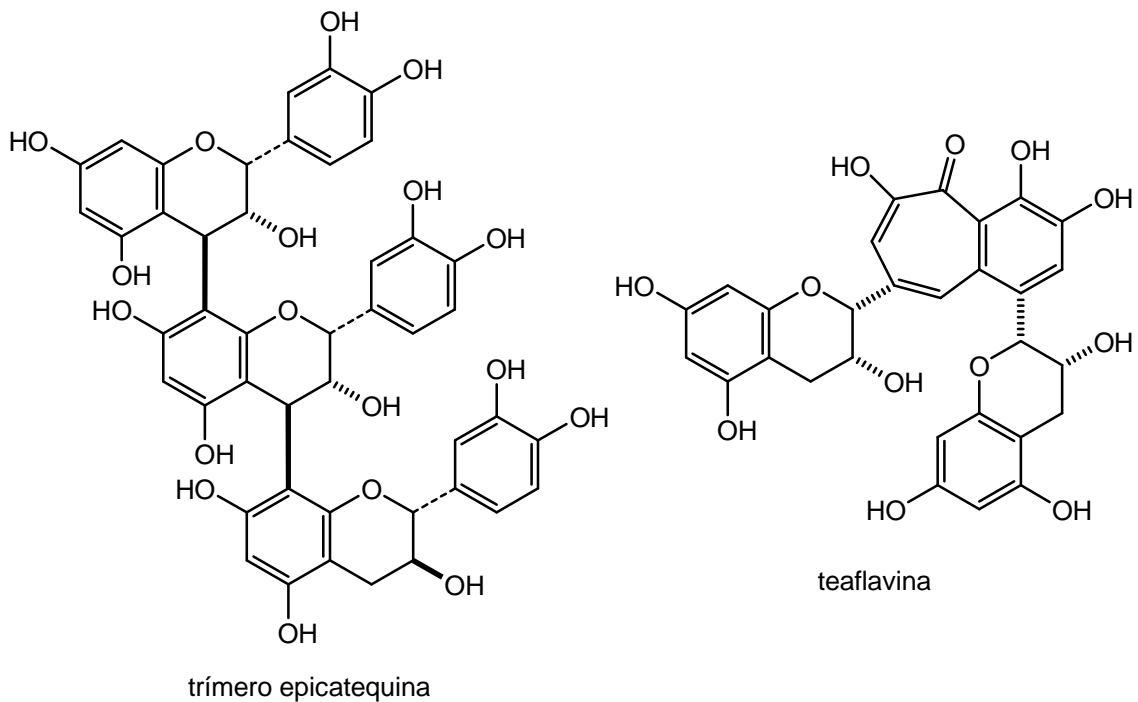


ácido gálico



ácido elágico

✿ **Taninos condensados** (catéquicos o proantocianidinas): son dímeros o polímeros flavánicos con uniones carbono-carbono entre las diferentes unidades de flavan-3-ol. Generalmente se forman por la polimerización de las catequinas y son muy resistentes a la hidrólisis. Sólo resultan afectados por la hidrólisis ácida y se convierten en antocianidinas, las cuales se pueden polimerizar para formar los flobafenos insolubles (color rojo intenso). Por destilación seca producen catecol. Por este motivo, reciben el nombre de taninos catequicos. Al tratar los taninos condensados con cloruro férrico aparece una coloración verde. Algunos ejemplos de este tipo de compuestos son el **trímero epicatequina**, el cual contribuye al sabor astringente de comidas y bebidas, y la **teaflavina**, un compuesto antioxidante encontrado en el té verde (*Camelia sinensis*) cuando se deja fermentar el material vegetal.^{8,9}



PARTE 1

Revisión de la flora terapéutica del Municipio de Acaxochitlán



Annona cherimola Mill.



Geranium schiedeanum Schl.

1.1 ANTECEDENTES

Municipio de Acaxochitlán

Su nombre deriva del nahuatl *acatl* "caña", *xochitl* "flor", que forman la palabra "Acaxochitl", planta así llamada que pertenece a la familia de los carrizos y flores en color rojo y *tlán* "lugar"; por lo cual Acaxochitlán se traduce como "lugar en que abunda el Acaxochitl".¹⁰

Se encuentra a 69 Km de distancia de la capital del Estado de Hidalgo, Pachuca de Soto, sus coordenadas geográficas son las siguientes: 20° 10' latitud Norte y 98° 12' latitud Oeste; tiene una altura sobre el nivel del mar de 2,260 m, y colinda al Sur con el Estado de Puebla y al Oeste con los municipios de Tulancingo de Bravo y Metepec.¹⁰

Descripción de plantas de uso tradicional ya descritas en el municipio



***Lopezia racemosa* Cav. ssp. *racemosa* (perilla)**

Se encuentra como maleza arvense y ruderal en Acaxochitlán, Atotonilco el Grande, Epazoyucan, Huasca, Mineral del Chico, Mineral del Monte, Omitlán, Pachuca y Singuilucan.¹¹

Uso tradicional

La infusión de la planta completa o sin raíz, se toma para diarrea y dolor de estómago.¹¹



***Tigridia pavonia* (L.f.) DC. (pavonia)**

Se localiza en sitios abiertos del bosque de *Quercus* y del bosque mesófilo de montaña en Acaxochitlán, Atotonilco el Grande, Mineral del Chico, Mineral del Monte, Omitlán y Xochicoatlán.¹¹

Uso tradicional

- * Ornamental: por la belleza de sus flores, ésta es una planta muy apreciada que se utiliza como ornamento. Se siembra en jardines y patios.
- * Comestible: en Xochicoatlán y Acaxochitlán la gente consume el bulbo subterráneo de esta planta.¹¹



***Digitalis purpurea* L. (cola de borrego)**

Crece en bosque de *Pinus*. Se encuentra en Acaxochitlán, Tenango y Zacualtipán.¹¹

Uso tradicional

- * Ornamental: la planta se siembra en patios, huertos y jardines.
- * Ritual: las flores se utilizan en los altares.

1.2 OBJETIVO

El objetivo de esta parte consistió en llevar a cabo un estudio de la flora medicinal del municipio de Acaxochitlán, Hidalgo, con la intención de identificar especies que pudiesen tener un uso terapéutico y comercial por parte de los habitantes del municipio.

1.3 RESULTADOS

Colecta de especies medicinales

Para llevar a cabo este trabajo, se contó con herramientas de campo, prensa, periódico, bolsas impermeables y equipo fotográfico. Se colectaron varias muestras de las especies consideradas como medicinales, se tomaron fotografías y se prepararon para su identificación botánica por parte del Biólogo Miguel Ángel Villavicencio Nieto del Centro de Investigaciones Biológicas del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la UAEH. Una vez clasificadas las plantas, se llevó a cabo una revisión bibliográfica para conocer si habían sido estudiadas o no, y qué estudios biológicos y/o químicos se habían descrito. Adicionalmente se buscaron informes del uso tradicional de las plantas.



Salidas de campo

Flora principal del municipio

La flora del municipio de Acaxochitlán está compuesta principalmente por especies de árboles como eucalipto, pino, encino, ocote, encino negro, oyamel y cedro rojo, así como especies no maderables como hongos, palma y musgo. También cuenta con árboles frutales de manzana, durazno, capulín, pera y chirimoya.

Recopilación de especies medicinales en diferentes localidades del municipio de Acaxochitlán

La descripción de las especies colectadas en las localidades visitadas de este municipio se muestra en las tablas siguientes. Las especies se agruparon por familia, se incluye el nombre científico, el nombre común en su caso y los usos medicinales informados o registrados. En aquellas plantas donde se ha explorado la composición química se indican los metabolitos aislados.

Santa Cecilia

Esta localidad es una hacienda donde se rentan cabañas para el descanso. Está situada al sur de Acaxochitlán y se encuentra en una zona de bosque. A continuación se describen las plantas identificadas.



***Heterotheca inuloides* Cass.**

Familia: Asteraceae

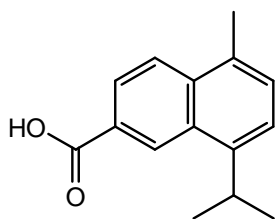
Nombre común: Árnica, árnica falsa.

Uso: contusiones (antiinflamatorio),
heridas, analgésico.¹²

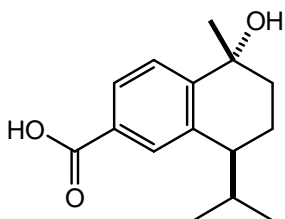
Parte estudiada: aérea

Principales compuestos aislados

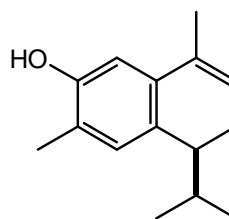
Referencia
13, 14, 15



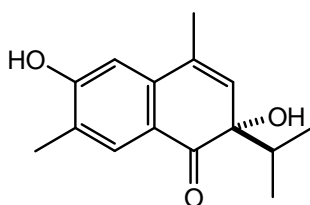
ácido cadalen-15-oico



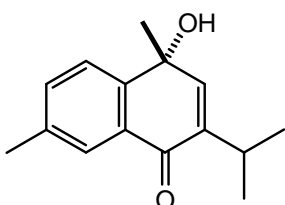
ácido 1 α -hidroxi-4 α -H-
1,2,3,4-tetrahidrocadalen-15-oico



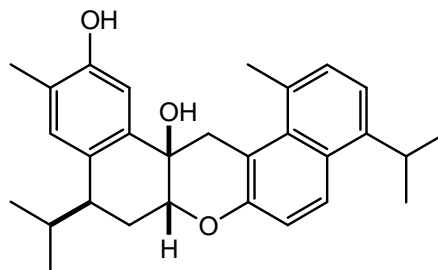
7-hidroxi-4 α -H-
3,4-dihidrocadalenoleno



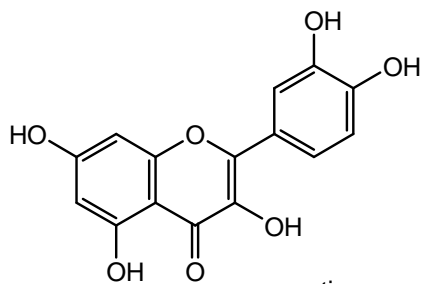
3,7-dihidroxi-3(4H)-
isocadalen-4-ona



1 α -hidroxi-3(4H)-
isocadalen-4-ona



dicadalenol



quercetina



Stevia eupatoria (Spreng.) Will.

Familia: Asteraceae

Nombre común: Hierba del borrego, cola de borrego.

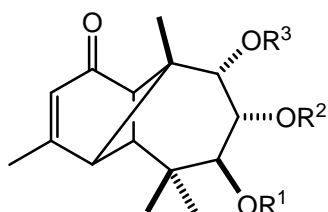
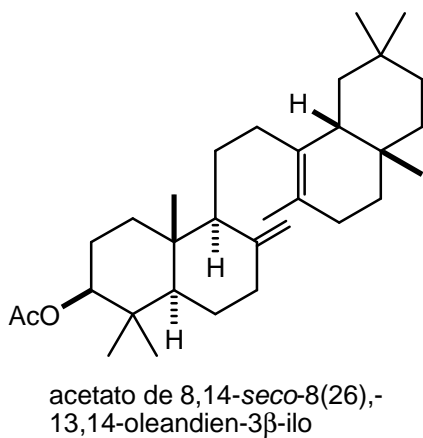
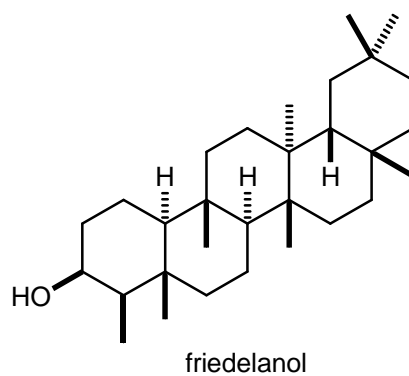
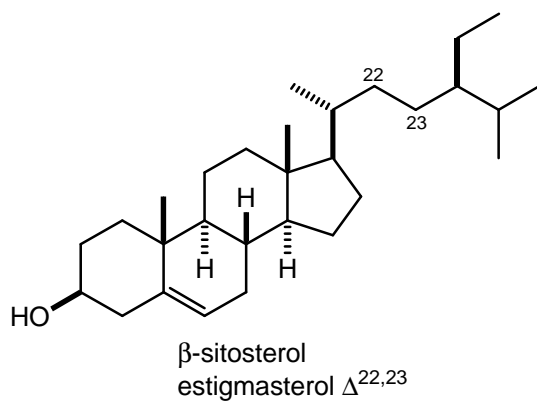
Uso: no registrado

Parte estudiada: raíces

Principales compuestos aislados

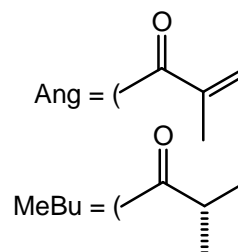
Referencia

16



Derivados del longipineno

R ¹	R ²	R ³
Ang	Ang	H
Ang	MeBu	H
Ang	H	MeBu
H	Ang	MeBu





Stevia jorullensis Kunth.

Familia: Asteraceae

Nombre común: Roselina

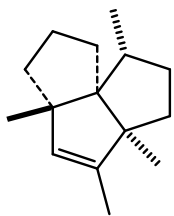
Uso: no registrado

Parte estudiada: raíces y aérea

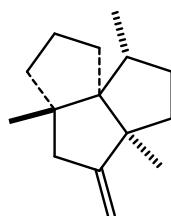
Principales compuestos aislados

Referencia

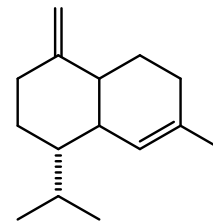
17



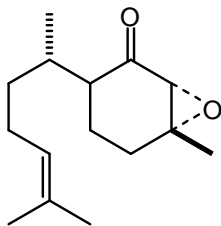
α -isocomeno



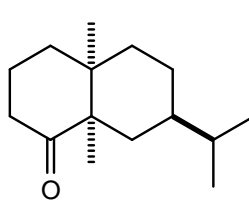
β -isocomeno



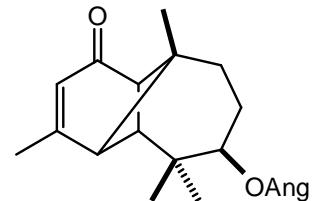
γ -cadineno



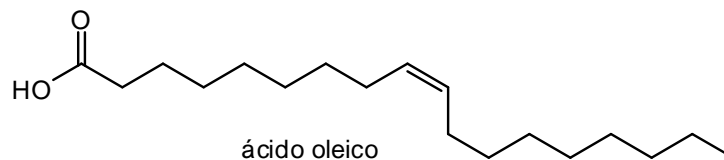
epoxibisabolenona



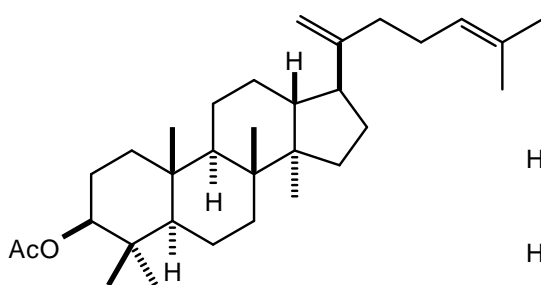
valeranona



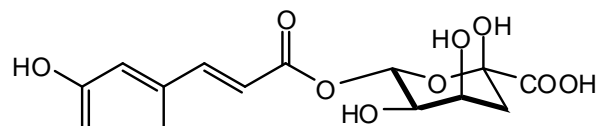
7-angeloil longipin-2-en-1-ona



ácido oleico



acetato de dammar-20(21),24-dienilo



ácido clorogénico



***Stevia serrata* Cav.**

Familia: Asteraceae

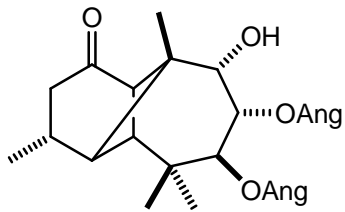
Nombre común: Cola de borrego, chile burro.

Uso: malestares intestinales¹⁸

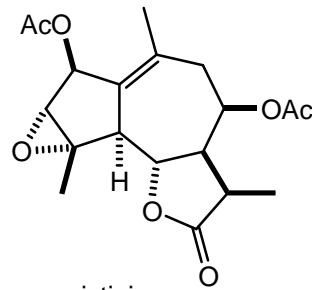
Parte estudiada: raíces y aérea

Principales compuestos aislados

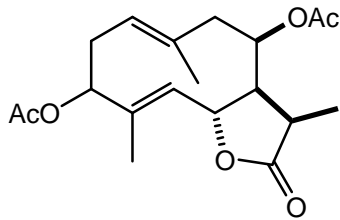
Referencia
18



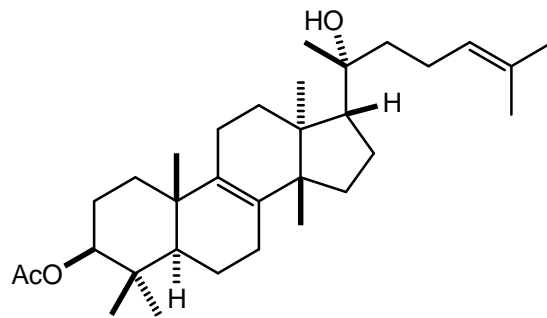
rasteviona



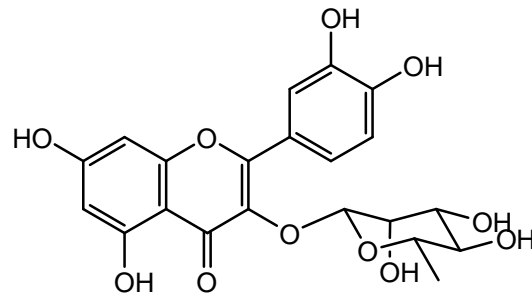
cristinina



carmelina



acetato de eufadiol



3-O-L-ramnósido de quercetina



***Geranium schiedeanum* Schl.**

Familia: Geraniaceae

Nombre común: Pata de león

Uso: lavado de heridas, para la fiebre¹⁹

No se han encontrado estudios químicos de esta especie.



***Monnina ciliolata* D.C.**

Familia: Polygalaceae

Nombre común: Tiñidora, tintórea

Uso: alivia el susto¹⁹

No se han encontrado estudios químicos de esta especie.



***Prunella vulgaris* L.**

Familia: Lamiacea (Labiatae)

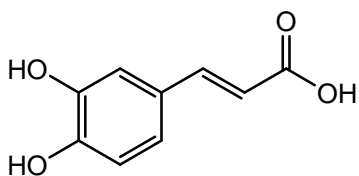
Nombre común: Hierba del cáncer

Uso: lavado de heridas, úlceras, hernias, cáncer de la matriz.²⁰

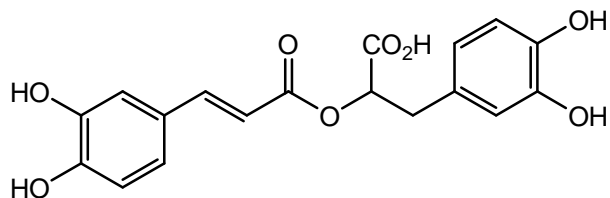
Parte estudiada: Aérea

Principales compuestos aislados

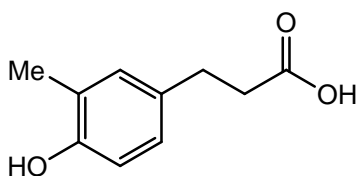
Referencia
21, 22



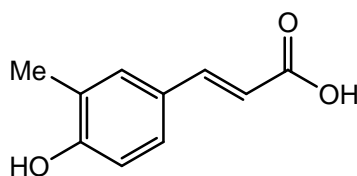
ácido cafeico



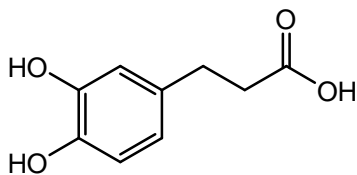
ácido rosmarinico



ácido dihidrofelúrico



ácido felúrico



ácido dihidrocafeico



***Buvardia ternifolia* (Cav.)**

Schlecht.

Familia: Rubiaceae

Nombre común: Trompetilla,
Trompetilla roja

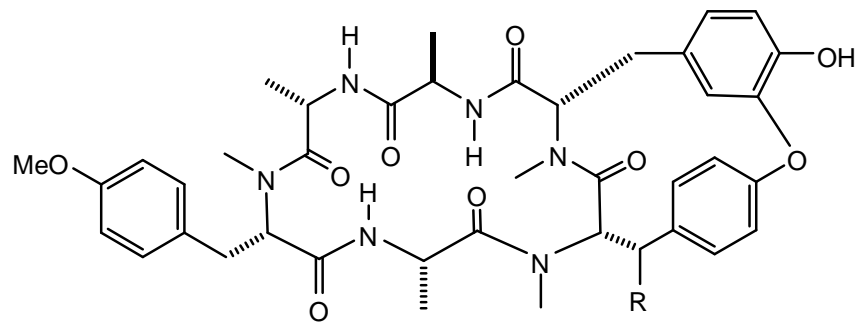
Uso: Piquetes y mordeduras de insecto,
hemorragia nasal, para el sarampión.¹¹

Parte estudiada: ramas, hojas,
flores

Principales compuestos aislados

Referencia

23



Bouvardina R = OH
deoxibouvardina R = H



***Penstemon roseus* (Sweet.) G.**

Don.

Familia: Scrophulariaceae

Nombre común: Jarritos, chulpa, cantaritos

Uso: Heridas infectadas, para quitar el susto, picaduras de insectos, para hacer limpias.¹⁹

No se han encontrado estudios químicos de esta especie.



***Eryngium carlinae* De Lar**

Familia: Umbelliferae

Nombre común: Hierba del sapo

Uso: Cálculos renales y otros problemas en los riñones.¹⁹

No se han encontrado estudios químicos de esta especie.

Chimalapa

En la localidad de Chimalapa, situada al norte y a 10 Km de Acaxochitlán, predominan la zarzamora, el durazno, el capulín, el acachul, los helechos y en menor abundancia el gordolobo y el eupatorio. A bordo de carretera se pudo apreciar con relativa abundancia *Digitalis purpurea*. Las plantas identificadas en la localidad se enlistan a continuación.



Gnaphalium sp.

Familia: Asteracea

Nombre común: Gordolobo

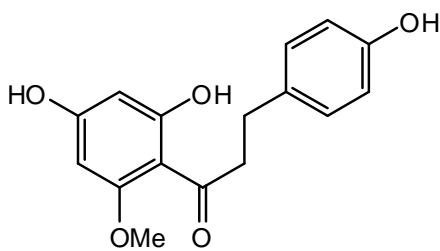
Uso: Enfermedades respiratorias¹⁹, contra dolor abdominal, los dolores causados por reumatismo, sirve para desinflamar quemaduras.¹²

Parte estudiada:

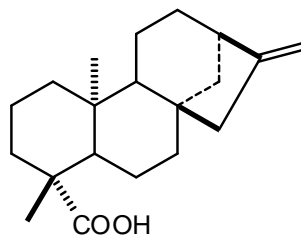
Principales compuestos aislados

Referencia

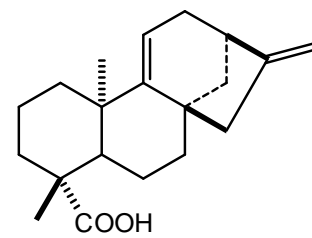
24



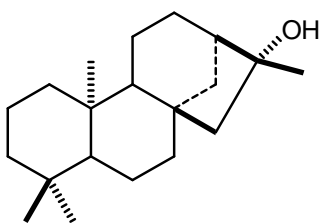
gnaphalina



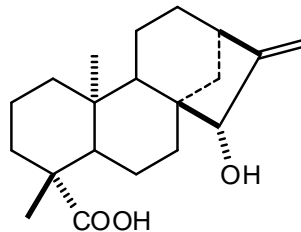
ácido (-)-*ent*-kaur-16-en-19-oico



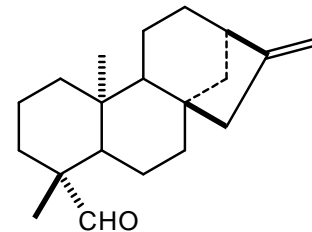
ácido grandiflorénico



kauranol



ácido 15-hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico



ácido 15-hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-al



Rubus sp.

Familia: Rosaceae

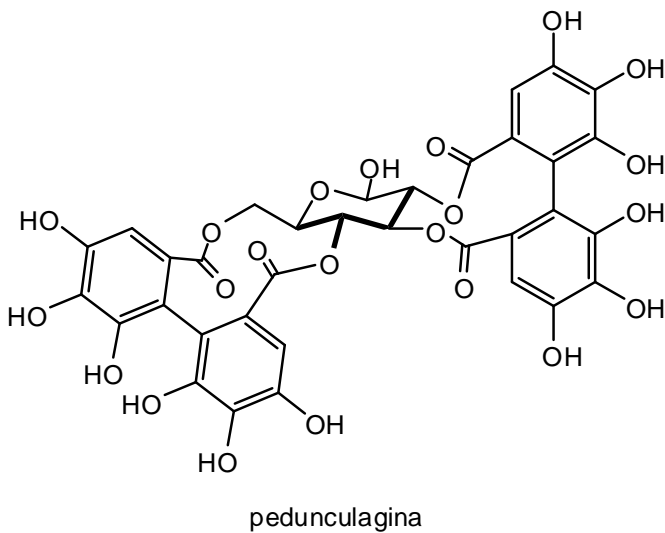
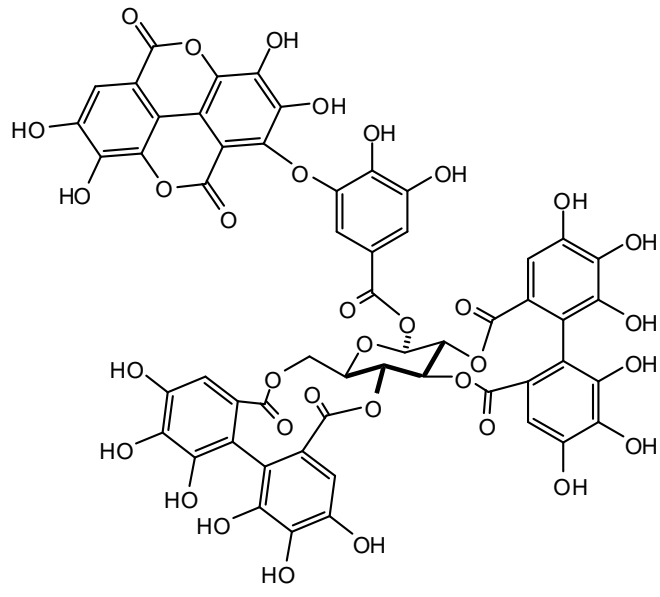
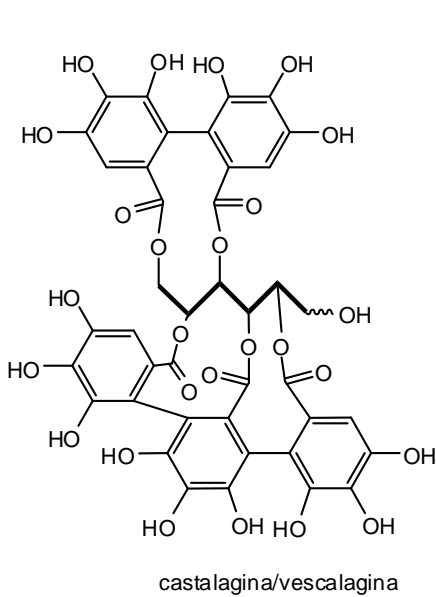
Nombre común: Zarzamora

Uso: Comestible, elaboración de mermeladas¹⁹, se estudia contra células cancerígenas²⁵

Parte estudiada: hojas,

Principales compuestos aislados

Referencia
25, 26





***Monnina ciliolata* DC.**

Familia: Polygalaceae

Nombre común: Tiñidora, tintórea

Uso: Relajante¹⁹

No se han encontrado estudios químicos de esta especie.



***Penstemon roseus* (Sweet.) G.**

Don

Familia: Scrophulariaceae

Nombre común: Jarritos, chulpa, cantaritos

Uso: Para curar heridas infectadas, relajación, el aire, alivia picaduras de insectos, hacer limpias¹⁹

No se han encontrado estudios químicos de esta especie.



Phytolacca icosandra L.

Familia: Phytolaccaceae

Nombre común: Acachul

Uso: Elaboración de vino

No se han encontrado estudios químicos de esta especie.



Digitalis purpurea L.

Familia: Scrophulariaceae

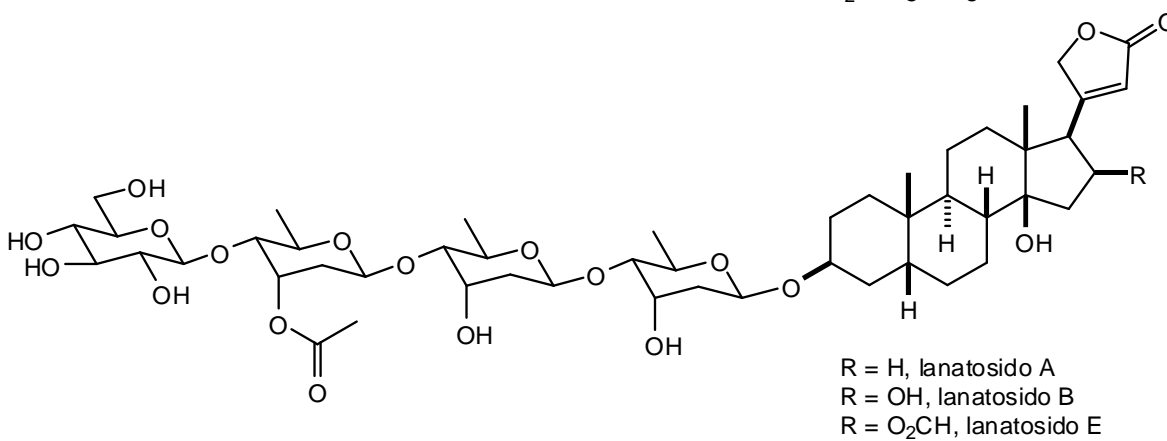
Nombre común: Digitalis

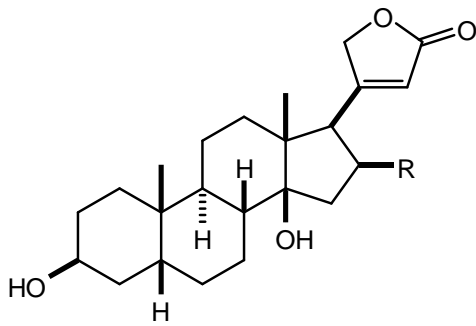
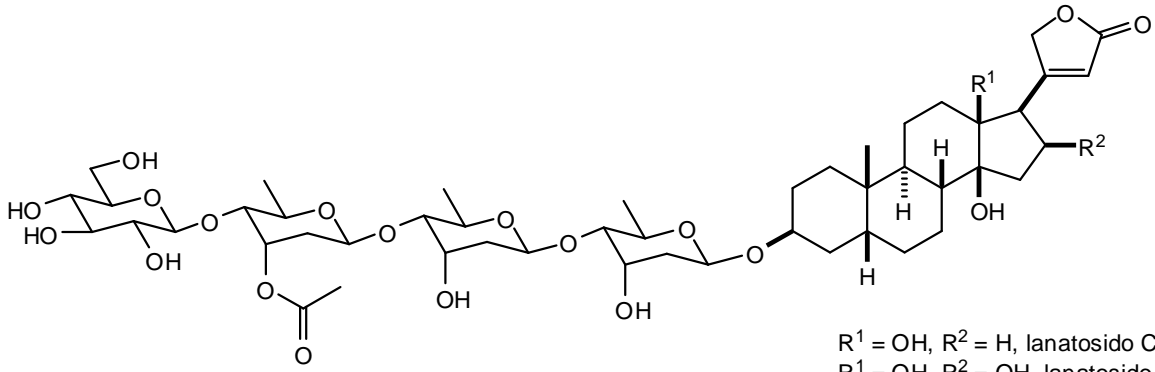
Uso: Tranquilizante¹¹, contra enfermedades cardíacas^{9,27}

Parte estudiada: hojas, flores

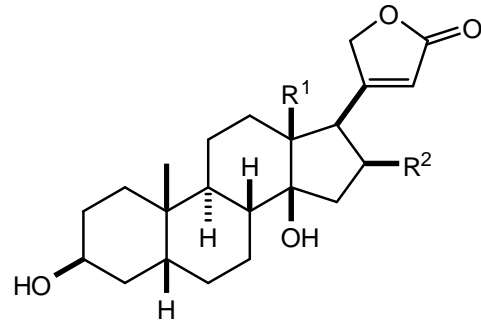
Principales compuestos aislados

Referencia
9, 27, 28





$R = \text{H}$, digitoxigenina
 $R = \text{OH}$, gitoxigenina
 $R = \text{O}_2\text{CH}$, gitaloxigenina



$R^1 = \text{OH}, R^2 = \text{H}$, digoxigenina
 $R^1 = \text{OH}, R^2 = \text{OH}$, diginigenina

Santa Catarina

En esta localidad, situada al norte de Acaxochitlán. Se han identificado algunas plantas medicinales como *Gnapahlum* (gordolobo), *Bouvardia ternifolia* (trompetilla), y anís, y de manera importante la planta *Annona cherimola* (chirimoya). Esta última especie es un árbol cuyo fruto es comestible, aunque se debe tener cuidado con el consumo de las semillas, dado que es conocido que pueden ser tóxicas.



***Annona cherimola* Mill.**

Familia: Annonaceae

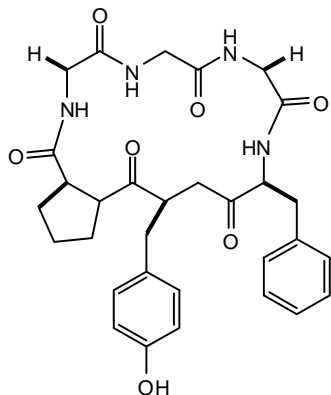
Nombre común: Chirimoya

Uso: contra la diarrea, infecciones intestinales y úlceras.

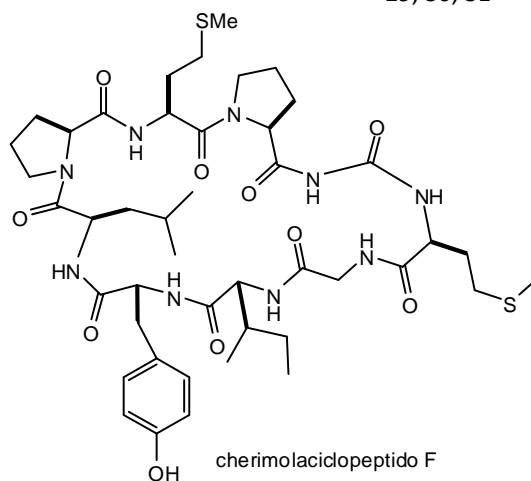
Parte estudiada: semillas

Principales compuestos aislados

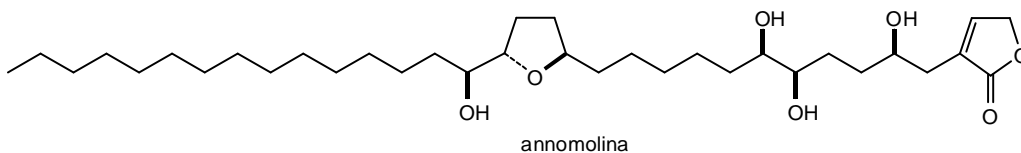
Referencia
29, 30, 31



cherimolaciclopeptido E



cherimolaciclopeptido F



anomolina

1.4 CONCLUSIONES

Se llevaron a cabo salidas de campo a diferentes localidades del municipio de Acaxochitlán, Hidalgo, donde se realizó la búsqueda de especies medicinales, las cuales fueron colectadas y preparadas para su identificación botánica. Posteriormente, se hizo una revisión bibliográfica de las plantas para conocer qué estudios químicos y biológicos se han llevado a cabo sobre ellas. Esto permitió conocer los metabolitos principales de cada especie, y que algunas de ellas todavía no han sido exploradas en su composición química. De algunas de estas plantas se ha descrito su actividad biológica y uso tradicional para tratar enfermedades como malestares gastrointestinales, infecciones, inflamación, cáncer y desórdenes cardíacos. Sin embargo, se apreció poca abundancia natural de la mayoría de ellas, lo cual no permitiría su empleo como plantas comerciales.

De todas la especies identificadas en este trabajo, se perciben dos especies que pudieran tener un uso comercial y medicinal importante, debido a que son abundantes y pudiesen ser cultivables: la zarzamora (*Rubus sp.*), de la cual se han realizado estudios contra células cancerígenas, y la chirimoya (*Annona cherimola*), de la que se ha descrito que tiene metabolitos con actividad biológica contra el cáncer. La zarzamora se encontró en casi todo el municipio de Acaxochitlán, principalmente en la localidad de Chimalapa, mientras que la chirimoya se encontró en Sta. Catarina.

PARTE 2

Estudio químico de *Geranium bellum*, *Geranium seemannii* y
Geranium potentillaefolium



G. bellum Rose



G. seemannii Peyr.



G. potentillaefolium DC.

2.1 ANTECEDENTES

Descripción y caracterización de *Geranium*

Por su clasificación taxonómica el género *Geranium* se encuentra dentro de la familia Geraniaceae Juss, la cual incluye entre alrededor de diez géneros a los que pertenecen unas 750 especies. Los géneros más conocidos son *Geranium* para especies silvestres y *Pelargonium* para especies de jardinería³². Las imágenes que se muestran a continuación permiten distinguir bien entre estos dos géneros.



Geranium



Pelargonium

Los nombres de estos géneros normalmente se confunden debido a que el término “geranio” es el nombre común de ciertas especies de *Pelargonium*. Los nombres de estas especies provienen del griego y se refieren a las formas semejantes a picos de aves que adquieren sus frutos. Así, *Geranium* proviene de *geranos* que significa grulla y *Pelargonium* deriva de *pelargos*, que significa cigüeña.³²

En el Estado de Hidalgo se han descrito 8 especies endémicas de *Geranium*, las cuales se describen en la Tabla 2.1.³³

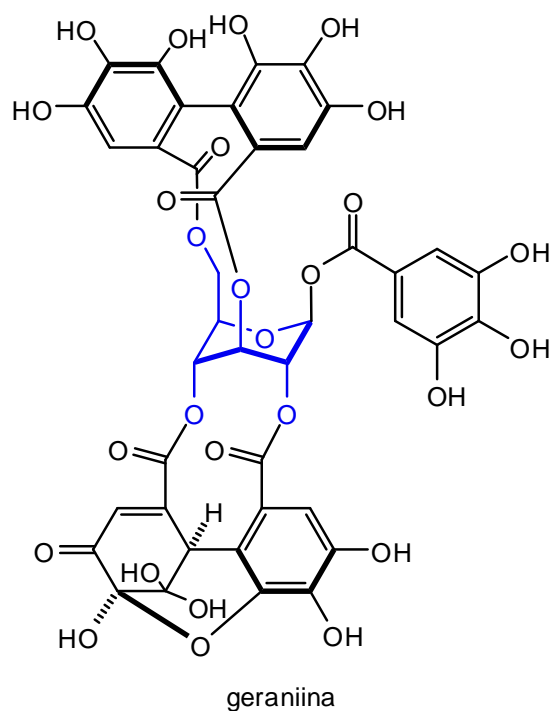
Tabla 2.1. Especies de *Geranium* endémicas del Estado de Hidalgo

Especie	Ubicación geográfica
<i>G. bellum</i> Rose	Acaxochitlán, Epazoyucan, Huasca de Ocampo, Mineral del Chico, Mineral de la Reforma, Omitlán de Juárez.
<i>G. cruceroense</i> Kunth	Todo el Estado de Hidalgo
<i>G. hernandesii</i> Moc. & Sessé ex DC.	Todo el Estado de Hidalgo
<i>G. latum</i> Small	Todo el Estado de Hidalgo
<i>G. lozani</i> Rose	Epazoyucan
<i>G. potentillaefolium</i> DC.	Epazoyucan, Huasca de Ocampo, Mineral del Chico, Mineral de la Reforma.
<i>G. schiedeanum</i> Schl.	Mineral del Chico, Mineral de la Reforma.
<i>G. seemannii</i> Peyr.	Acaxochitlán, Epazoyucan, Huasca de Ocampo, Mineral del Chico, Mineral de la Reforma, Omitlán de Juárez, Pachuca.

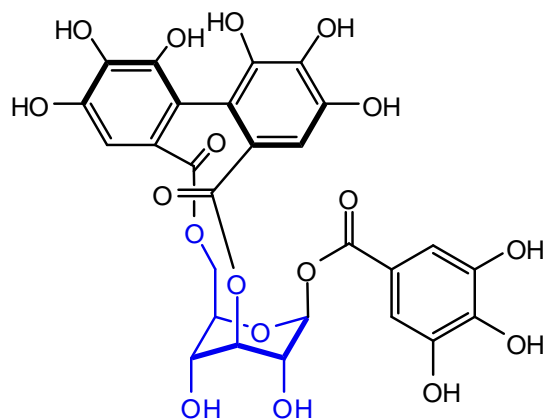
Actividad biológica y compuestos químicos de especies de *Geranium*

Existen estudios farmacológicos de especies de *Geranium*, en los que se reporta su actividad biológica: astringente, diurética, ligeramente hipoglucemiante³⁴, antioxidante³⁵, antiviral³⁶, antiinflamatoria³⁷, antidiarreica³⁸ y contra el virus de hepatitis B³⁹.

Entre los compuestos de mayor importancia aislados de la especies de *Geranium* se encuentran los taninos, entre los que destacan **geraniina** y **corilagina**. La geraniina es considerado como un tanino hidrolizable, fue aislado de *Geranium thumbergii* SIEB. *Et Zucc.* en 1977 por Okuda y colaboradores en un intento de obtener el principio activo de esta planta medicinal, que es uno de los medicamentos más populares en Japón contra la diarrea⁴⁰. Tiene actividad astringente³⁴, es antioxidante, presenta actividad antihipertensiva⁴¹ y recientemente se ha encontrado que inhibe el virus del herpes VSH-2⁴².



La corilagina es un derivado de la geraniina⁴³, fue aislada inicialmente de *Caesalpinia coriaria* en 1951 por Schmidt y colaboradores, es un potenciador de antibióticos β -lactámicos, presenta actividad antiviral y antimicrobiana, es un efectivo antihipertensivo e inhibe la quitina sintasa⁴⁴. En la actualidad se ha demostrado que este compuesto también presenta actividad antiinflamatoria⁴⁵, posee actividad antioxidante y hepatoprotectora⁴⁶.

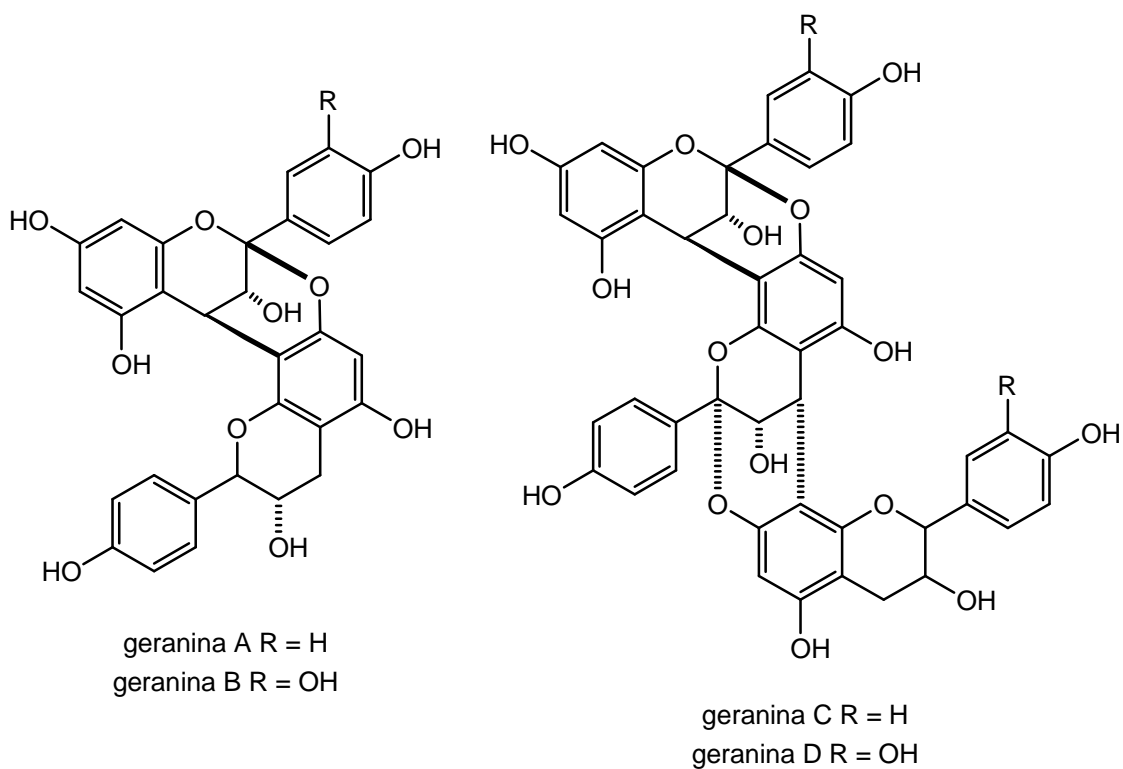


corilagina

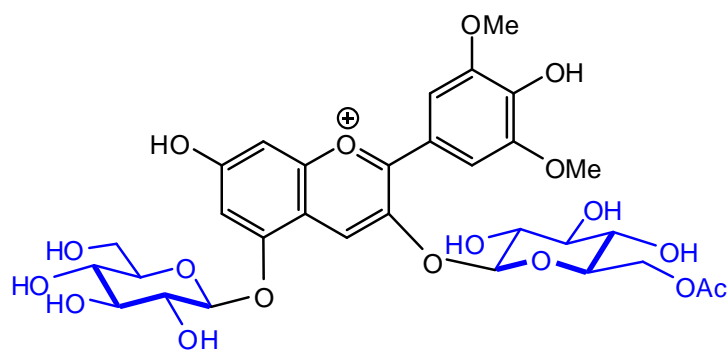
Entre otras especies de *Geranium* estudiadas se encuentran las siguientes:

Geranium robertianum L. Esta planta se usa para afecciones en los ojos, irritación ocular y conjuntivitis, estomatitis, faringitis, gingivitis, herpes, eccemas e infecciones de la piel³⁵. Recientemente, un estudio de esta especie mostró que posee actividad antiinflamatoria³⁷.

Geranium niveum. Esta especie posee actividad antiprotozoaria⁴⁷, y de sus raíces se aislaron inicialmente dos protocianidinas, **geranina A** y **geranina B**⁴⁸, y posteriormente, en el 2001 se aislaron la **geranina C** y la **geranina D**.⁴⁹



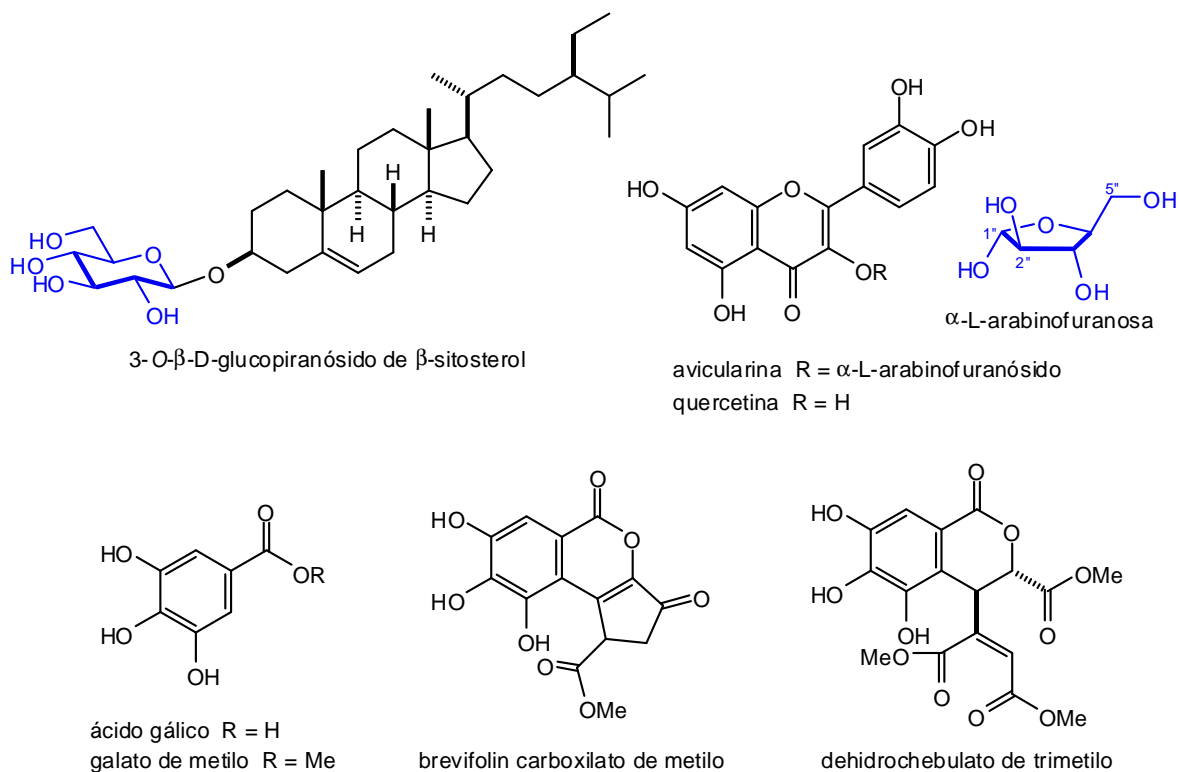
De las flores de *Geranium sylvaticum* se aisló la antocianidina 3-O-(6-O-acetil)- β -D-glucopiranosido-5-O- β -D-glucopiranosido de malvidina⁵⁰.



3-O-(6-O-acetil- β -D-glucopiranosido)-
5-O- β -D-glucopiranosido de malvidina

Geranium sibiricum Linne se usa para tratar la inflamación intestinal, es un antioxidante y se ha encontrado que tiene actividad antiproliferativa en las células hepáticas Chang,⁵¹ mientras que los extractos de *Geranium calolinianum* L. mostraron actividad contra el virus de la Hepatitis B (VHB).³⁹

Recientemente, en nuestro equipo de trabajo se describió el aislamiento y caracterización de los constituyentes antioxidantes de *Geranium bellum* Rose. De esta planta se aislaron 3-O-β-D-glucopiranosido de β-sitosterol, 3-O-α-L-(2''-O-acetil)arabinofuranósido de quercetina, avicularina, quercetina, ácido gálico, galato de metilo, brevifolin carboxilato de metilo y dehidrochebulato de trimetilo.⁵²



En el presente trabajo, se continuó con el estudio químico de *G. bellum*, en adición de *G. seemannii* y *G. potentillaefolium*.

2.2 JUSTIFICACIÓN

El estudio químico de especies medicinales siempre ha permitido contar con sustancias altamente promisorias para el tratamiento de diversas enfermedades. Actualmente, se sigue recurriendo al uso de productos naturales para la prevención o control de varios padecimientos crónicos o los causados por agentes infecciosos. Esto ha ido en aumento al reconocer la eficacia de estos recursos, ya que muchas personas, de todas las clases sociales, confían en las sustancias o productos de origen natural.

Con el estudio químico de las especies de *Geranium* descritas en este trabajo, las cuales han sido empleadas en medicina tradicional, se pretende contribuir al conocimiento de sustancias naturales que en un futuro pudiesen tener una aplicación importante para el tratamiento de enfermedades, y con una metodología para su aislamiento y caracterización.

2.3 OBJETIVOS

Los objetivos de esta parte consistieron en lo siguiente:

- ✿ Llevar a cabo el estudio químico de los extractos hexánicos de las raíces y parte aérea de *Geranium bellum*, *G. seemanii* y del extracto de acetato de etilo de la parte aérea de *G. potentillaefolium*.
- ✿ Contribuir al conocimiento de sustancias naturales, las cuales pudieran tener un uso relevante para el tratamiento de algunas enfermedades, particularmente como agentes antioxidantes.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extractos hexánicos de las raíces y parte aérea de *Geranium bellum*, *Geranium seemannii* y *Geranium potentillaefolium*.

Los extractos hexánicos tanto de la parte aérea como de las raíces de las tres especies se obtuvieron mediante reflujo por 6 horas y se desengrasaron mediante precipitación con MeOH caliente → frío, filtrado y concentrado en el rotavapor.

Los extractos, excepto el de *G. potentillaefolium*, se sometieron a separación mediante técnicas cromatográficas, usando gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de hexano-AcOEt-MeOH en diferentes polaridades como eluyente. Las fracciones obtenidas de cada cromatografía se monitorearon mediante cromatografía en placa fina, lo cual permitió juntar aquellas que tuvieron la misma relación de frente (R_f). Las recromatografías sucesivas de cada fracción en las mismas condiciones, condujo al aislamiento de dos metabolitos principales contenidos en los extractos, en adición de sustancias grasas. Los dos metabolitos se analizaron mediante sus datos físicos y espectroscópicos, principalmente por RMN de ^1H y de ^{13}C , así como por comparación con muestras auténticas obtenidas con anterioridad en nuestro grupo de trabajo. Esto permitió la caracterización de las sustancias como el β -sitosterol (**1**) y el 3-O- β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (**2**). En la Figura 2.4.1 se esquematiza el comportamiento cromatográfico que tuvieron los extractos. En todos los casos, el compuesto **1** fue el de mayor concentración, obteniendo desde 300 a 600 mg de cada extracto, mientras que del compuesto **2** se obtuvieron entre 20 y 30 mg de cada uno.

Cabe mencionar que se hizo una comparación mediante cromatografía en capa fina de los extractos hexánicos de las raíces de las tres especies (ver Parte Experimental), donde se pudo observar que el β -sitosterol (**1**) también es el metabolito más abundante en el extracto de *G. potentillaefolium*.

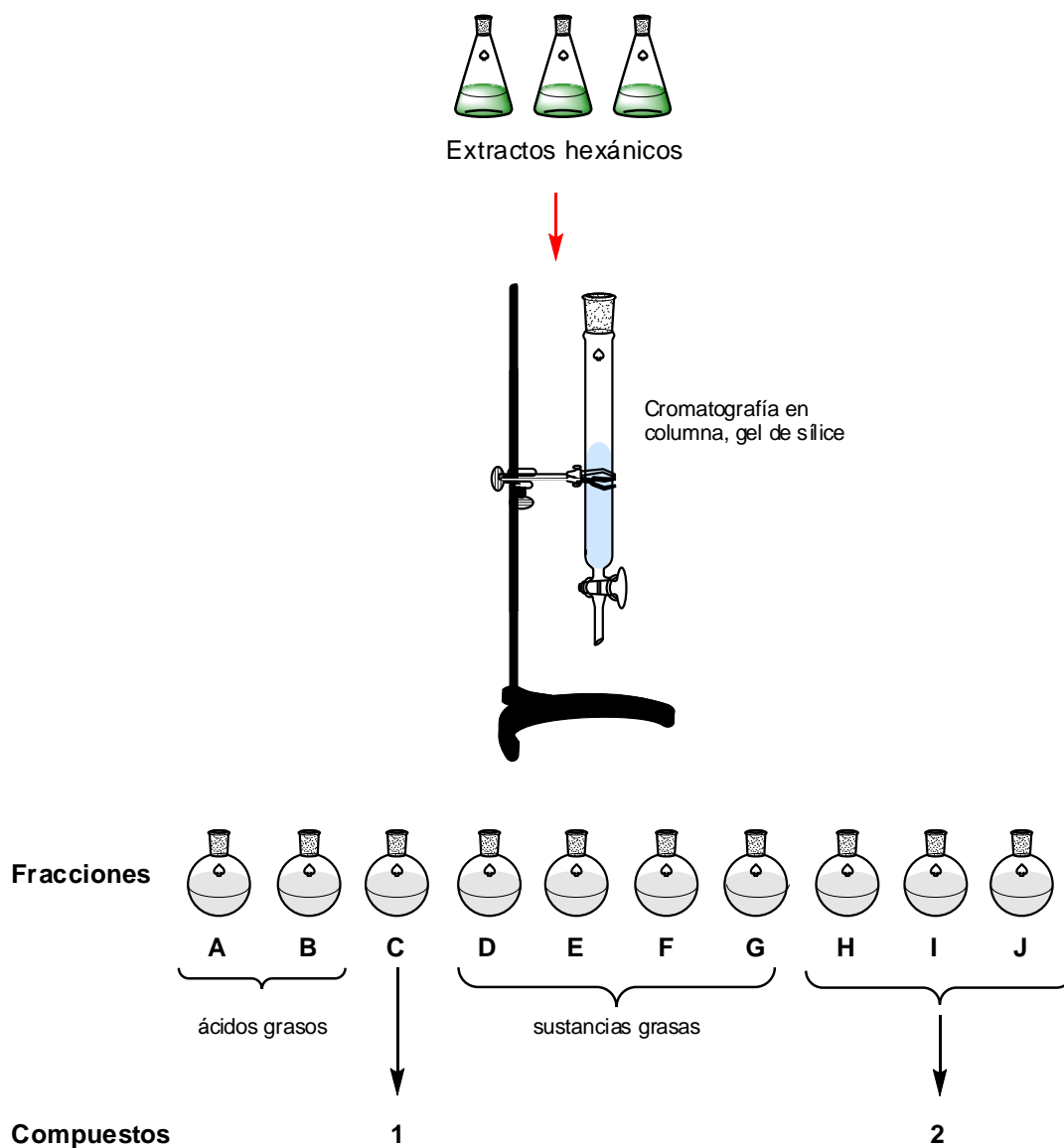
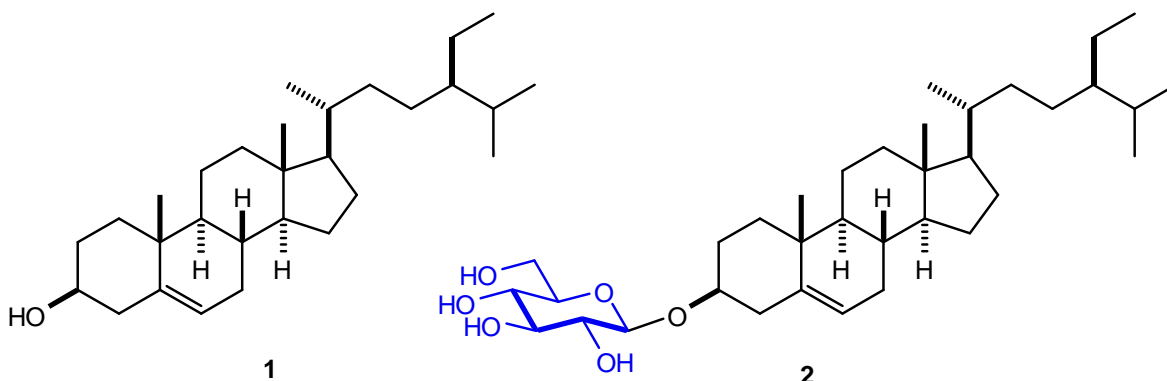


Figura 2.4.1. Separación cromatográfica de los extractos hexánicos de las raíces y parte aérea de *G. bellum*, *G. seemanii* y *G. potentillaefolium*.



El β -sitosterol (**1**) es un compuesto muy común en casi todas las plantas y es considerado como metabolito secundario ya que forma parte de las paredes celulares. Es una sustancia comercial y sus datos físicos y espectroscópicos son bien conocidos por lo que su descripción no se incluye en esta parte.

El compuesto **2**, aunque también es una sustancia conocida, es menos frecuente que el β -sitosterol. Su espectro de RMN de ^1H se muestra en la Figura 2.4.2 (Tabla 2.2), en el cual, entre sus señales más significativas, se observó una señal simple ancha en 5.35 ppm característica del protón vinílico H-6, y la señal doble ($J = 7.7$ Hz) en 5.09 ppm correspondiente al protón anomérico H1' de la parte de la glucosa. Adicionalmente, entre 3.90 y 4.70 ppm se observaron las señales típicas de los protones H-6a' - H6b' bases de los OHs del azúcar. El protón H-3, base de oxígeno de la parte β -sitosterol, se apreció cercano a 4 ppm sobrepuesta con H-5'. La comparación de sus datos de RMN de ^{13}C (Figura 2.4.3, Tabla 2.3) con una muestra auténtica, así como con datos de la literatura,⁵³ permitió confirmar la estructura de esta sustancia como el 3-O- β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (**2**).

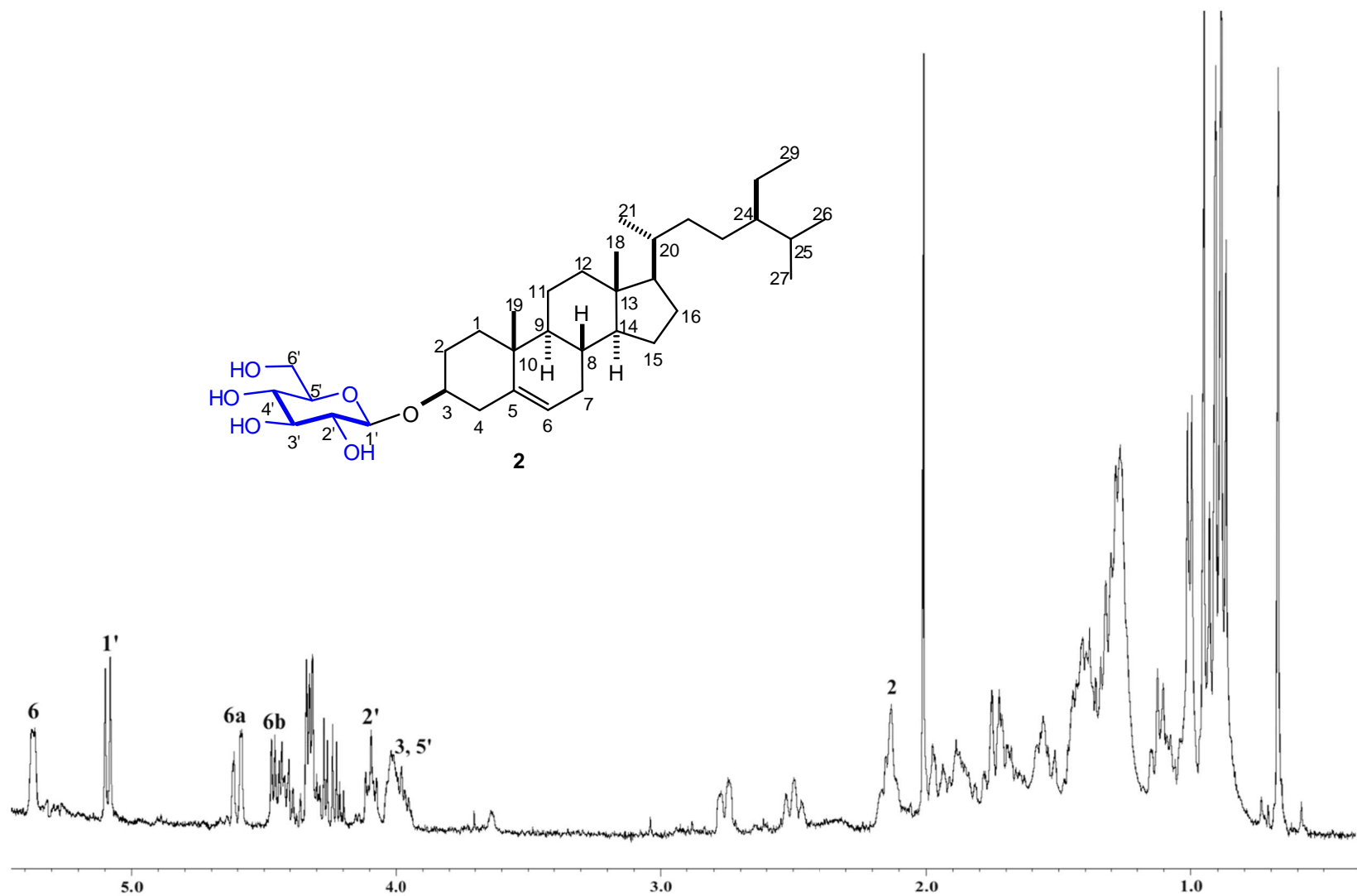


Figura 2.4.2. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de 3-O-β-D-glucopiranosido de β-sitosterol (2) en piridina-*d*₅.

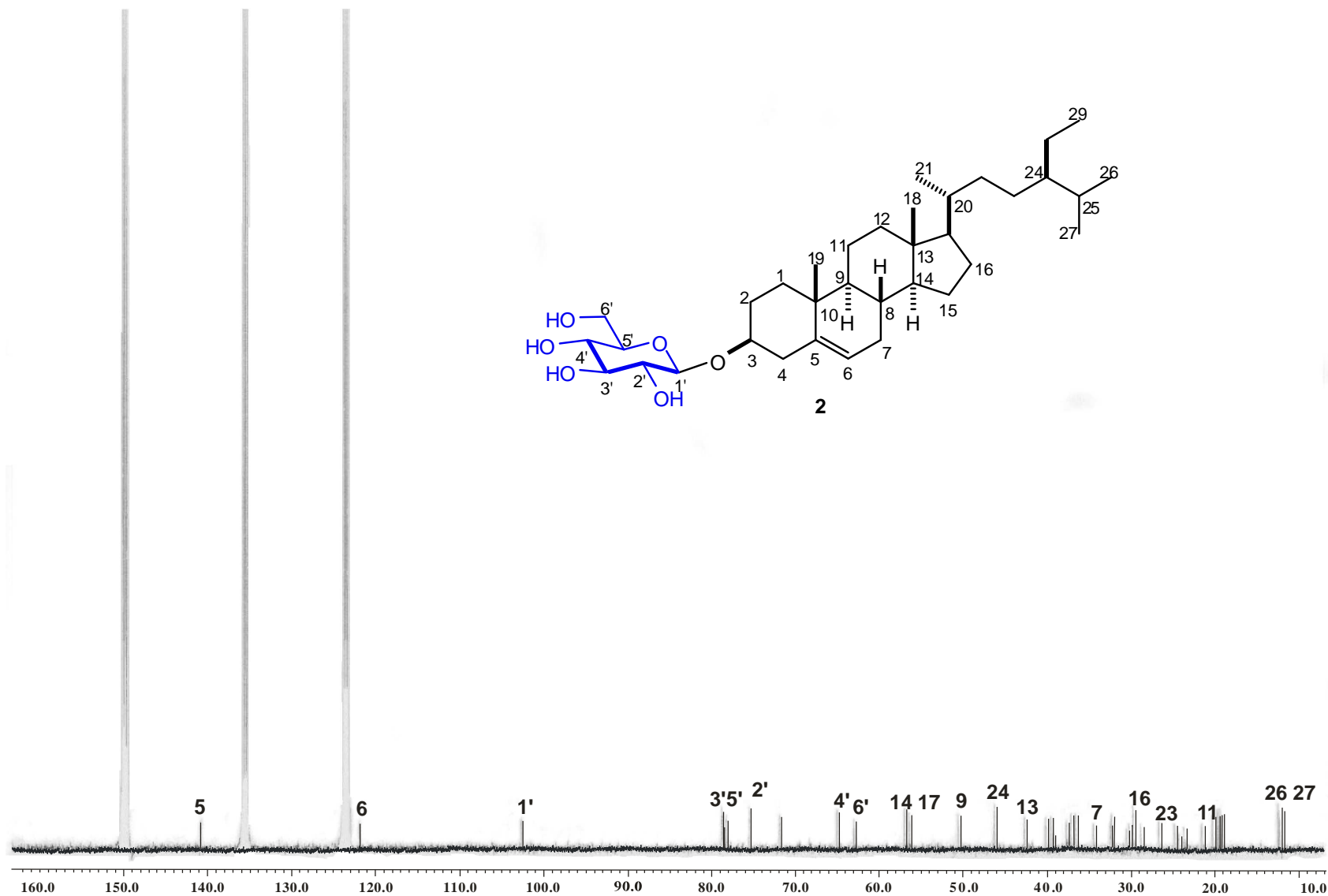


Figura 2.4.3. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) del 3-O- β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (2) en piridina- d_5 .

Tabla 2.2. Datos de RMN de ^1H experimentales y de la literatura⁵³ del 3-*O*- β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (**2**), desplazamientos químicos (δ) en ppm, en piridina-*d*₅.

<i>H</i>	δ experimental	δ literatura
2	2.13 m	2.14 m
6	5.37 s	5.35
18	0.67 s	0.66
1'	5.09 (d, $J = 7.7$)	5.04 (d, $J = 7.7$)
2'	4.09 (dd, $J = 8, 7.7$)	4.04 (dd, $J = 7.7, 7.5$)
6a	4.60 (dd, $J = 2.2, 11.7$)	4.55 (dd, $J = 2.5, 11.8$)
6b	4.45 (dd, $J = 5.1, 11.7$)	4.40 (dd, $J = 5.2, 11.8$)

Tabla 2.3. Datos de RMN de ^{13}C experimentales y de la literatura⁵³ del 3-O- β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (**2**), desplazamientos químicos (δ) en ppm, en piridina- d_5 .

<i>c</i>	<i>δ experimental</i>	<i>δ literatura</i>
1	37.36	37.49
2	31.94	30.21
3	78.38	78.38
4	39.22	39.31
5	140.79	140.95
6	121.80	121.90
7	30.12	32.14
8	32.06	32.04
9	50.22	50.34
10	36.27	36.08
11	21.16	21.26
12	39.83	39.95
13	42.36	42.47
14	56.71	56.83
15	24.39	24.48
16	28.43	28.50
17	56.12	56.25
18	11.86	11.95
19	19.30	19.39
20	36.81	36.36
21	18.89	18.99
22	34.09	34.20
23	26.26	26.40
24	45.92	46.04
25	29.85	29.47
26	19.09	19.20
27	19.86	19.94
28	23.27	23.38
29	12.04	12.13
1'	102.46	102.57
2'	75.23	75.27
3'	78.50	78.54
4'	71.58	71.67
5'	77.98	78.13
6'	60.85	62.82

Extracto de acetato de etilo de la parte aérea de *Geranium potentillaefolium*

El extracto de AcOEt de la parte aérea (hojas, tallos y flores) de *G. potentillaefolium* se obtuvo mediante reflujo por 6 horas, filtrado y concentrado en el rotavapor. Este extracto se desengrasó mediante la adición de MeOH, calentamiento, reposo durante 24 h, filtrado y concentrado. La adición de una mezcla de MeOH-H₂O (1:1) a este producto, dio lugar a la obtención de una parte soluble (denominada **Fracción Polar**) y otra parte insoluble (etiquetada como **Fracción no Polar**). La **Fracción Polar** se filtró y se concentró en el rotavapor para obtener un residuo, el cual se sometió a separación cromatográfica empleando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y mezclas de MeOH-H₂O como fase móvil (eluyente). Esto permitió el aislamiento de los metabolitos ácido gálico (**3**), (-)-corilagina (**4**), geraniina (**5**), quercetina (**6**) y kaempferol (**7**) y de acuerdo como se muestra en la Figura 2.4.4. Cada fracción obtenida de la cromatografía se monitoreó mediante cromatografía en capa fina.

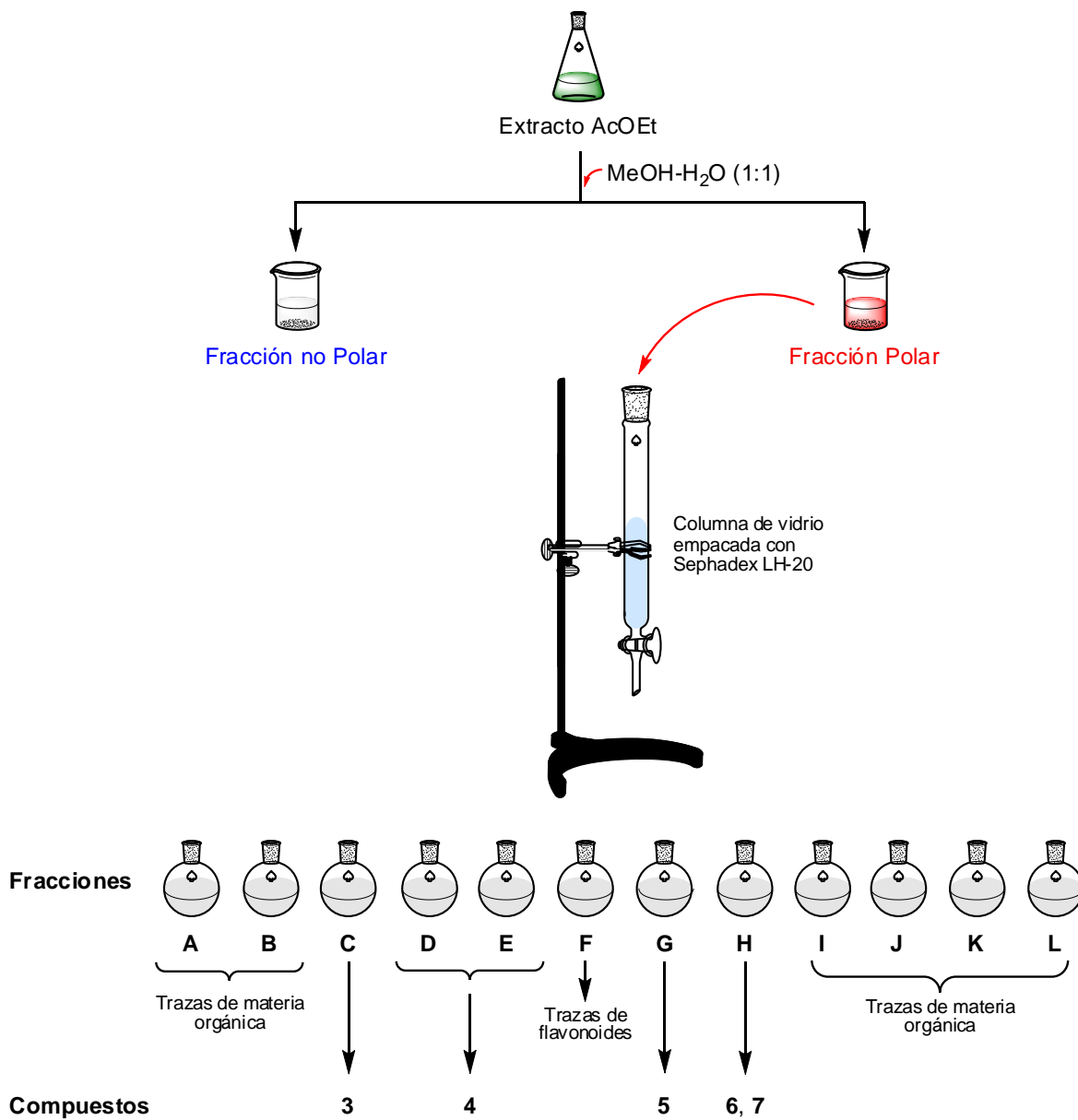
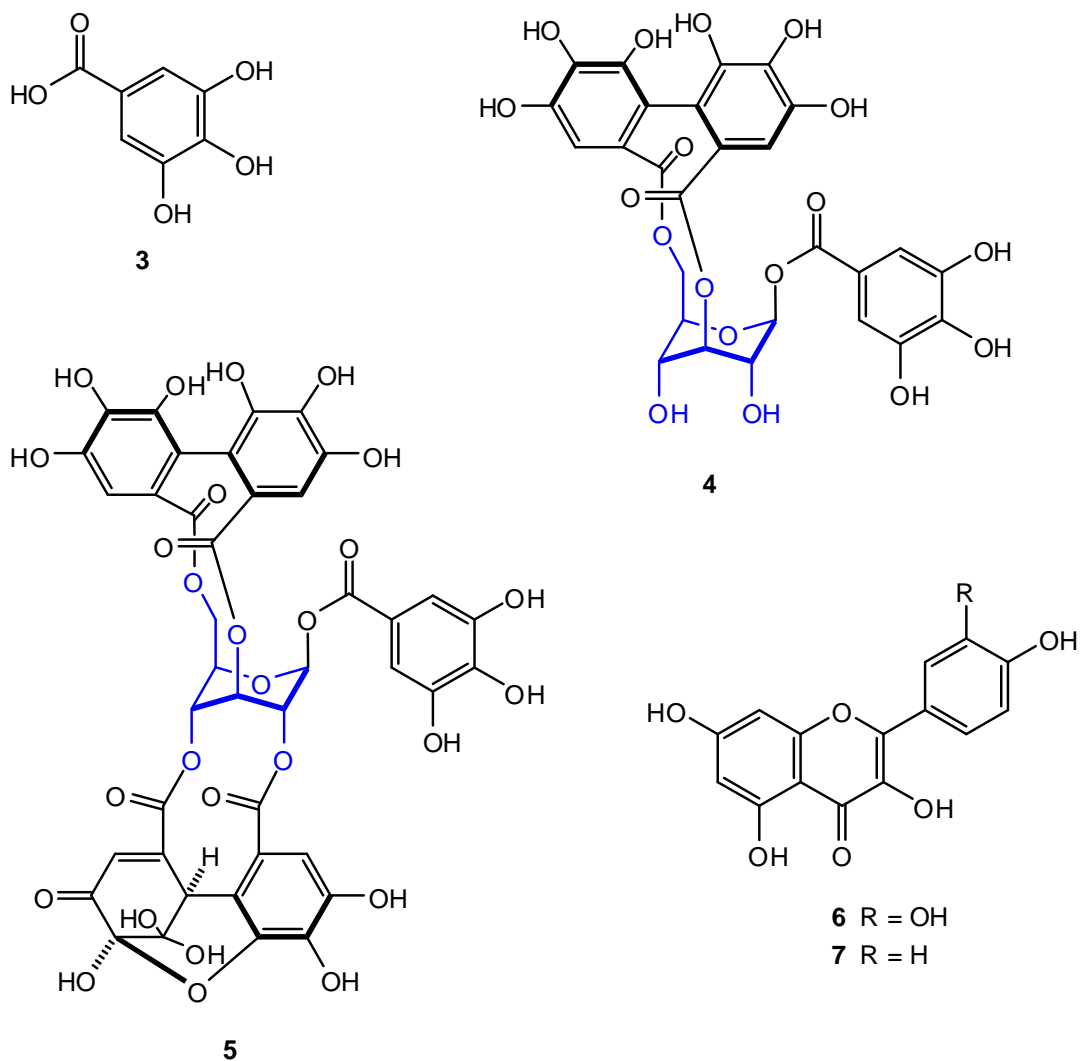


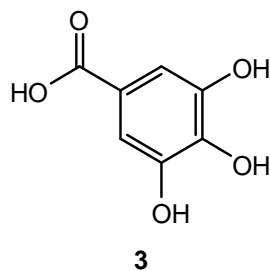
Figura 2.4.4. Separación cromatográfica del extracto de AcOEt de la parte aérea de *G. potentillaefolium*



Por otro lado, la separación cromatográfica de la **Fracción no polar**, usando gel de sílice y como eluyentes hexano, CHCl_3 , AcOEt, acetona y H_2O , condujo a la obtención del glucósido de β -sitosterol (**2**).

Todos los compuestos se caracterización mediante sus datos físicos y sus propiedades espectroscópicas, principalmente por RMN de ^1H y de ^{13}C , de la manera como se describe en seguida.

El espectro de RMN de ^1H de ácido gálico (**3**) (Figura. 2.4.5) es muy simple, prácticamente sólo se observa una señal simple en 6.91 ppm que es característica de los protones 2 y 6 del anillo aromático. Esta sustancia ya ha sido obtenida en nuestro grupo de trabajo y la comparación de su espectro con el espectro de una muestra auténtica, en adición de la comparación mediante cromatografía en capa fina, permitió su caracterización.



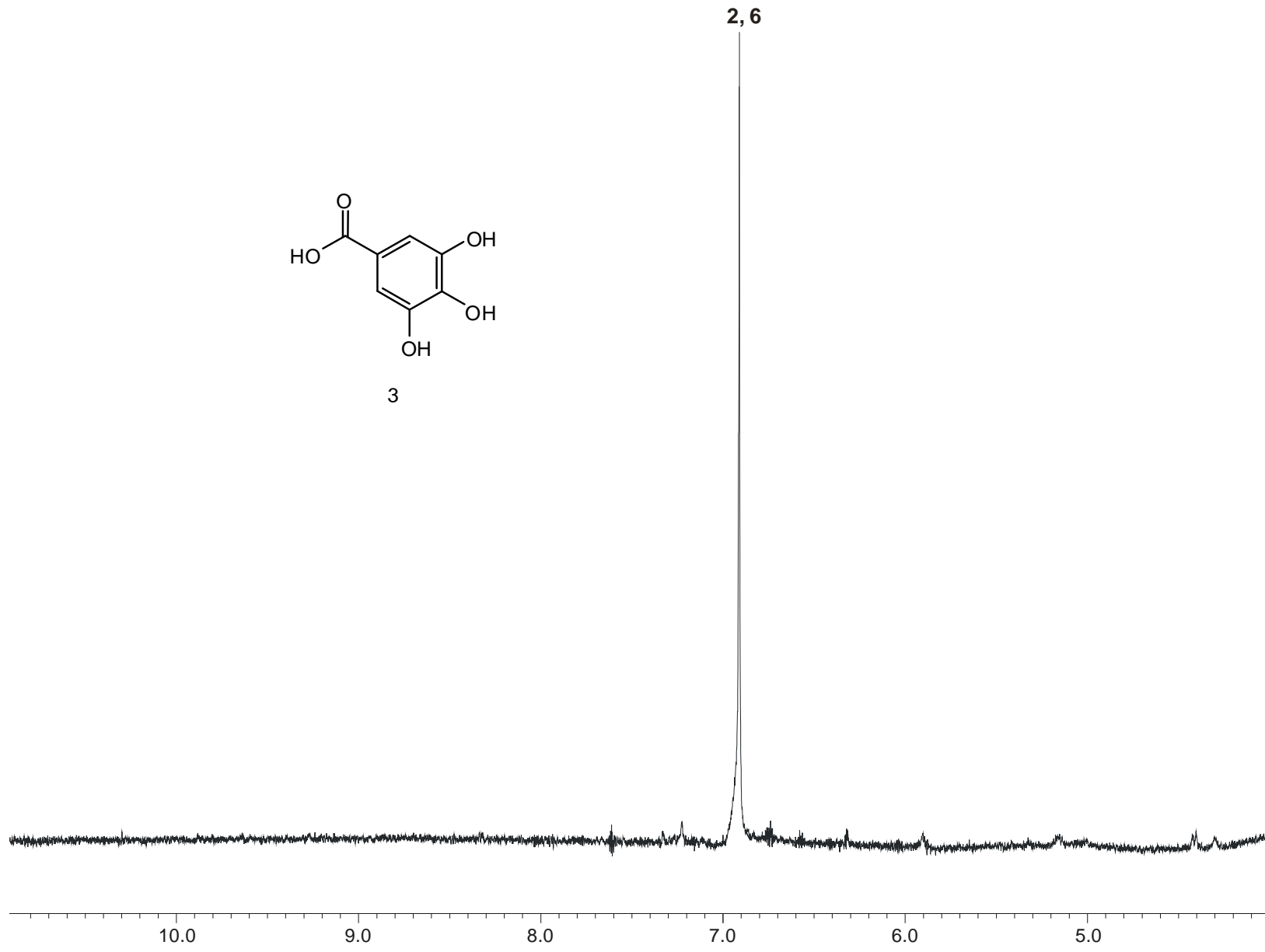


Figura 2.4.5. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de ácido gálico (3) en DMSO-d₆

La corilagina (**4**) se aisló en forma de hojuelas de color café claro. En su espectro de ^1H (Figura 2.4.6) se observaron tres señales simples en 6.68, 6.83 y 7.12 ppm que se asignaron los protones H-2 y H-6 del anillo A (galófilo), a H-3 del anillo B y H-3 del ciclo C, respectivamente. De la misma manera se apreció una señal simple en 6.36 ppm que correspondió al protón anomérico H-1 del azúcar. Entre 4 y 5 ppm se observaron las señales de los demás protones de la azúcar (Tabla 2.4).

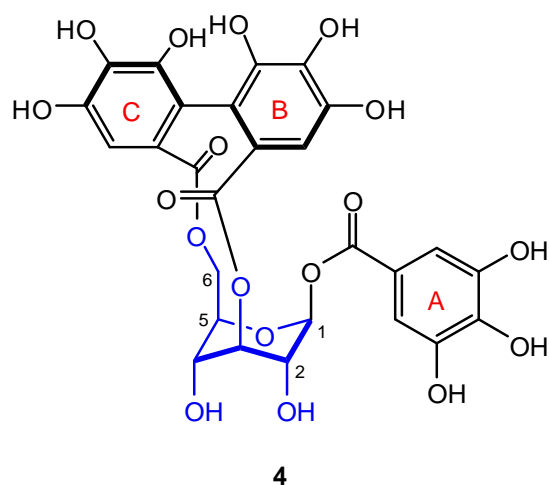


Tabla 2.4 Datos de RMN de ^1H (400 MHz) de corilagina (**4**) en acetona- d_6 .⁵⁴

	<i>Experimental</i>	<i>literatura</i>
H	δ en ppm (m, J en Hz)	δ en ppm (m, J en Hz)
1	6.36 (d, 2.2)	6.38 (d, 2)
2	4.05s	4.06s
3	4.81s	4.82s
4	4.44s	4.46s
5	4.50 (t, 9.52)	4.52 (t, 10.8)
6b	4.11 (dd, 11, 8.04)	4.11m
6a	4.88 (t, 11)	4.95 (t, 10.8)
3C	6.68s	6.71s
3B	6.83s	6.82s
2A, 6A	7.12s	7.12s

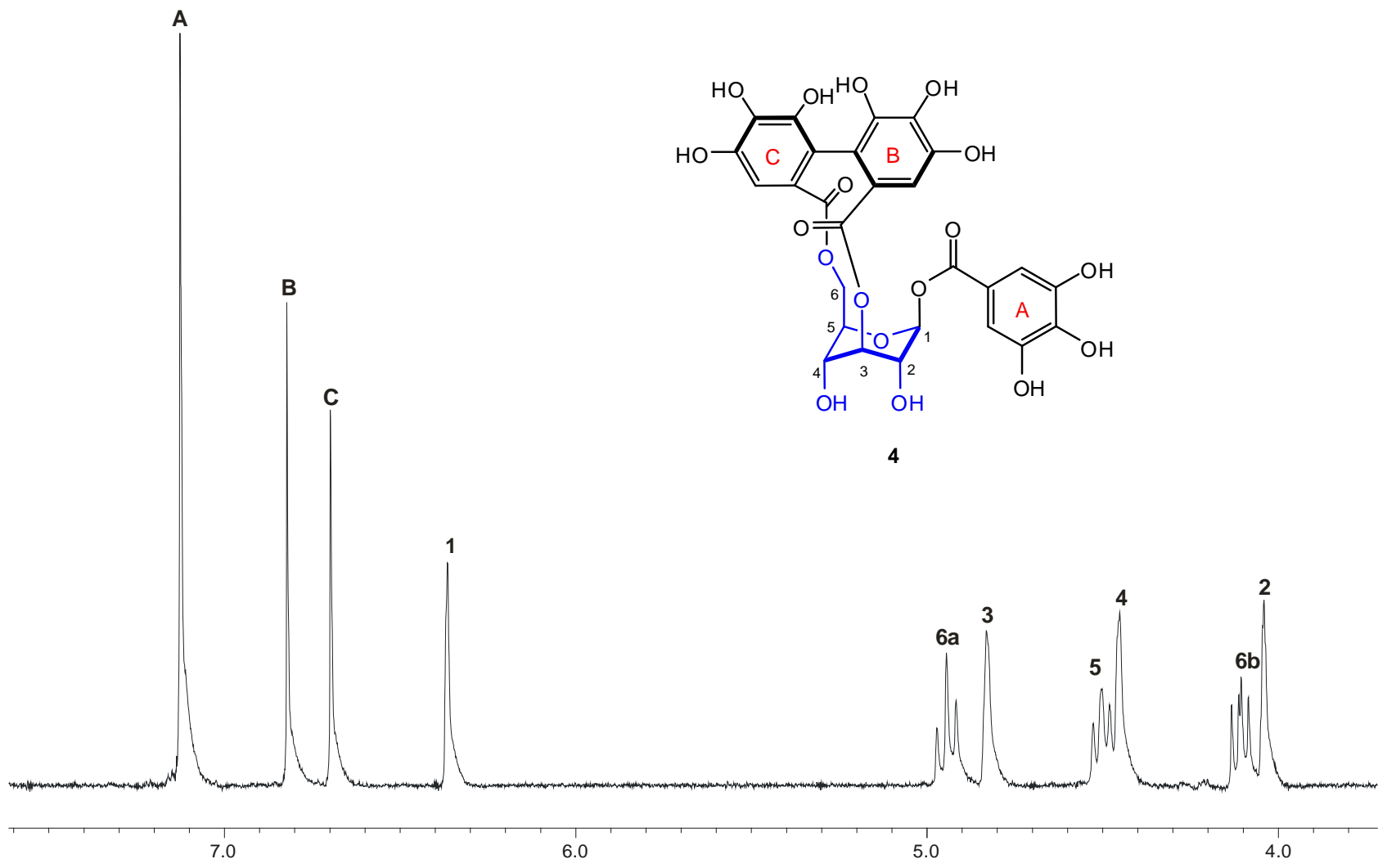


Figura 2.4.6. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de corilagina (**4**) en acetona-*d*₆.

Para la caracterización de del compuesto **4**, se analizó el espectro de RMN ^{13}C (Figura. 2.4.7) del cual se obtuvieron los siguientes datos (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Datos de RMN de ^{13}C (400 MHz) de corilagina (**4**) en acetona- d_6 ^{54, 55}.

	<i>Experimental</i>	<i>Literarura</i>
C	δ en ppm	δ en ppm
4	61.4	61.7
6	63.6	64.8
2	68.4	68.3
3	70.2	70.2
5	74.9	74.9
1	93.4	94.0
3B	107.3	107.5
3C	109.1	109.8
2A,6A	110.0	110.3
1B	115.3	115.3
1C	115.9	116.3
1A	119.9	119.8
2B	124.7	124.6
2C	124.9	124.9
5B	135.8	136.1
5C	136.3	136.8
4A	138.6	139.2
4B	144.2	144.3
4C	145.2	145.3
C = O A	164.5	165.5
C = O B	166.5	167.0
C = O C	167.8	168.5

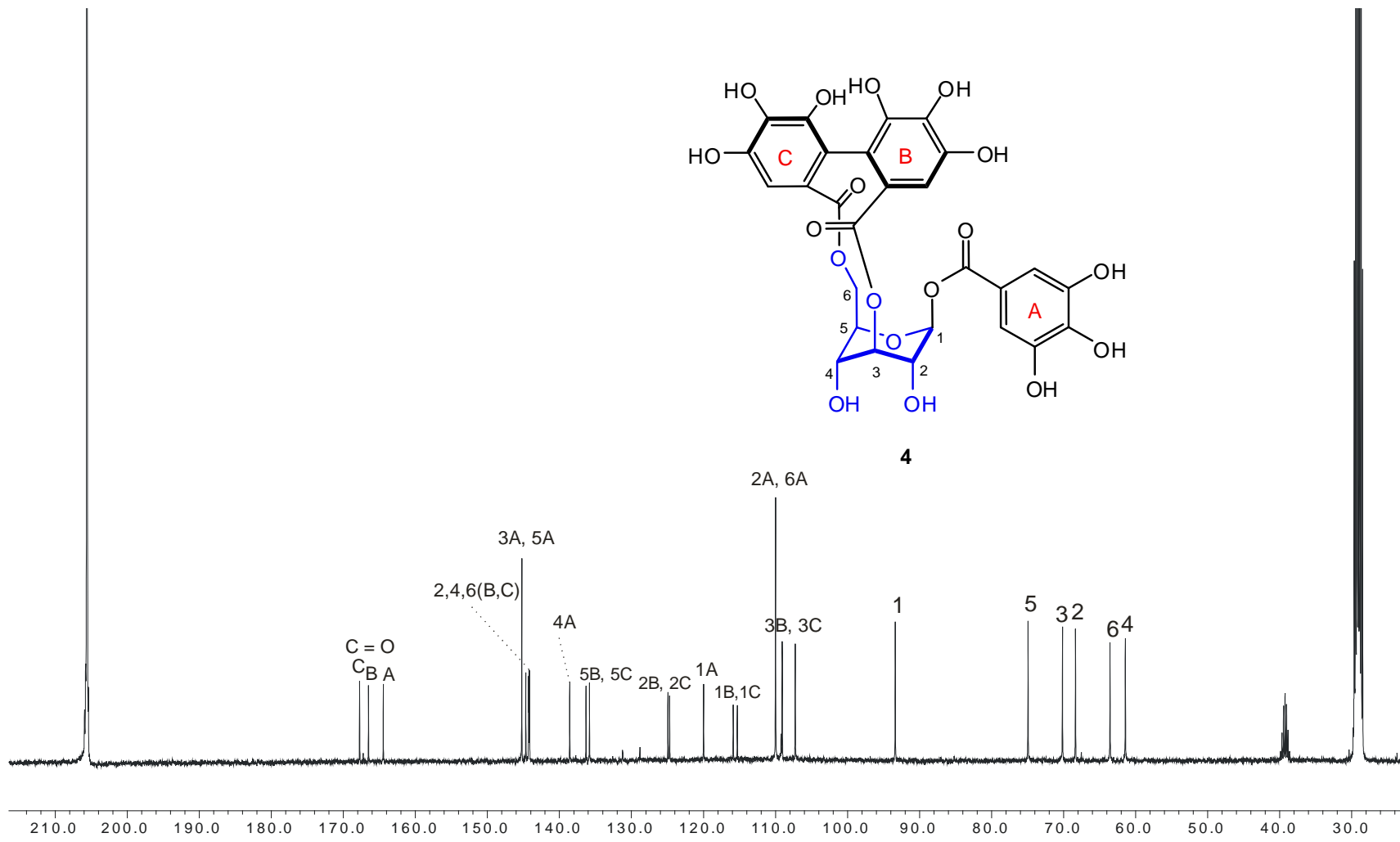
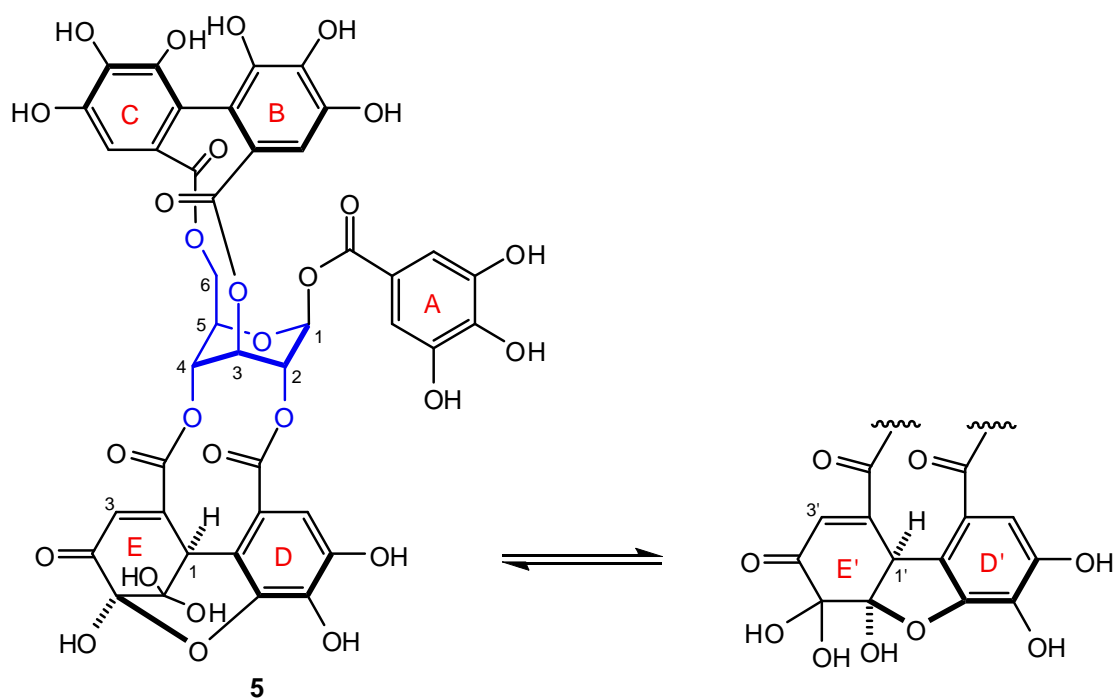


Figura 2.4.7. Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz) de corilagina (4) en acetona-d₆.

La geraniina (**5**) se obtuvo en forma de hojuelas de color café oscuro. Se caracterizó mediante sus datos de RMN de ^1H (Figura 2.4.9) los cuales se compararon con la literatura⁴⁰. Es conocido que la geraniina en solución tiene un comportamiento de una mezcla de dos compuestos isoméricos, siendo la parte de los anillos **D** y **E** en donde recae este isomerismo. El oxígeno que hace el puente entre los dos anillos en uno de los casos forma un heterociclo de 6 miembros y en el otro caso uno de cinco. Este equilibrio se inicia cuando el compuesto se disuelve en una mezcla de acetona-agua, en la cual es soluble, y a medida que va transcurriendo el tiempo se va formando el isómero de cinco miembros. Cuando transcurren unas 12 horas se puede observar cantidades equimolares de cada isómero. En este caso, en la figura 2.4.8, se muestra el espectro de ^1H de la sustancia cuando habían transcurrido aproximadamente 15 minutos desde su disolución. Las señales corresponden al isómero de 6 miembros, aunque ya se puede observar un conjunto de señales pequeñas correspondientes al otro isómero. Estas señales se etiquetaron con números en primas. En la tabla 2.6 se dan los desplazamientos observados para este tanino.



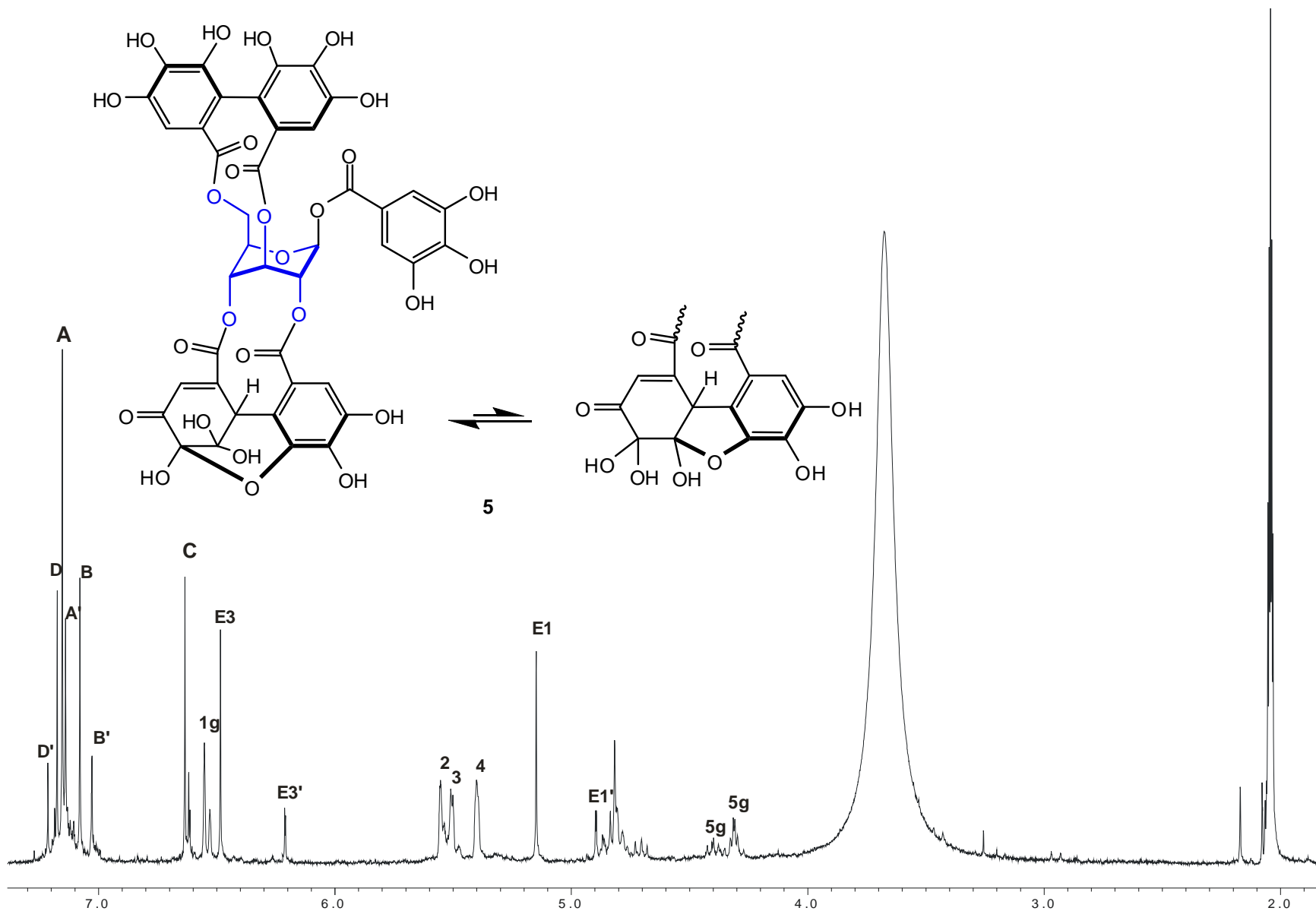


Figura 2.4.8. Espectro de RMN ¹H (400 MHz) geraniina (5) en acetona-*d*₆ – D₂O (9:1)

Tabla 2.6. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) de la geraniina (**5**) en acetona- d_6 - D_2O .

<i>H</i>	$\delta H / \text{ppm}$
E1	5.15s
E3	6.48s
E1''	4.94s
E3''	6.21s
A	7.15s
B	7.08s
D	7.17s
A''	7.14s
B''	7.03s
D''	7.21s

Aunque la estructura y configuración absoluta de la geraniina (**5**) ya ha sido establecida y corroborada por difracción de rayos-X,⁴³ se decidió llevar a cabo una hidrólisis ácida de este compuesto en la cual se pudieron obtener el ácido gálico (**3**) el ácido elágico (**5a**), en una proporción aproximada de 1:1. La formación de estos compuestos a partir de la geraniina ya ha sido descrita⁴⁰ por lo cual se confirma la estructura del tanino **5**.

El ácido elágico (**5a**) se caracterizó por RMN ^1H (Figura 2.4.9), presentando una señal simple en 7.46 ppm debidas a los protones aromáticos y obtuvo un espectro de RMN ^{13}C (Tabla 2.7, Figura 2.4.10) y ácido gálico (**3**) se asignó con RMN de ^1H , en donde también se apreció una señal simple en 6.91 ppm característica de los protones H-2 y H-6 de este compuesto.

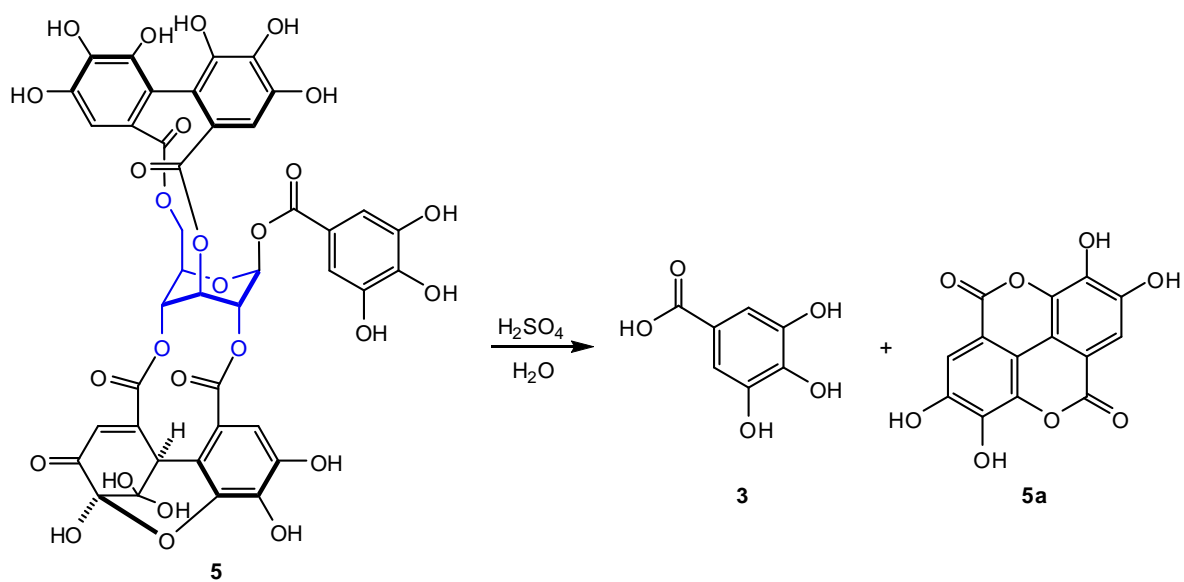


Tabla 2.7. Datos de RMN de ^{13}C (100 MHz) del ácido elágico (**5a**) en $\text{DMSO-}d_6$.⁵⁶

	<i>Experimental</i>	<i>Literatura</i>
C	δ en ppm	δ en ppm
3, 3'	108.2	107.4
2, 2'	110.8	110.1
1, 1'	112.8	112.3
5, 5'	136.9	136.3
6, 6'	140.1	139.8
4, 4'	148.7	148.1
-COO-	159.7	159.1

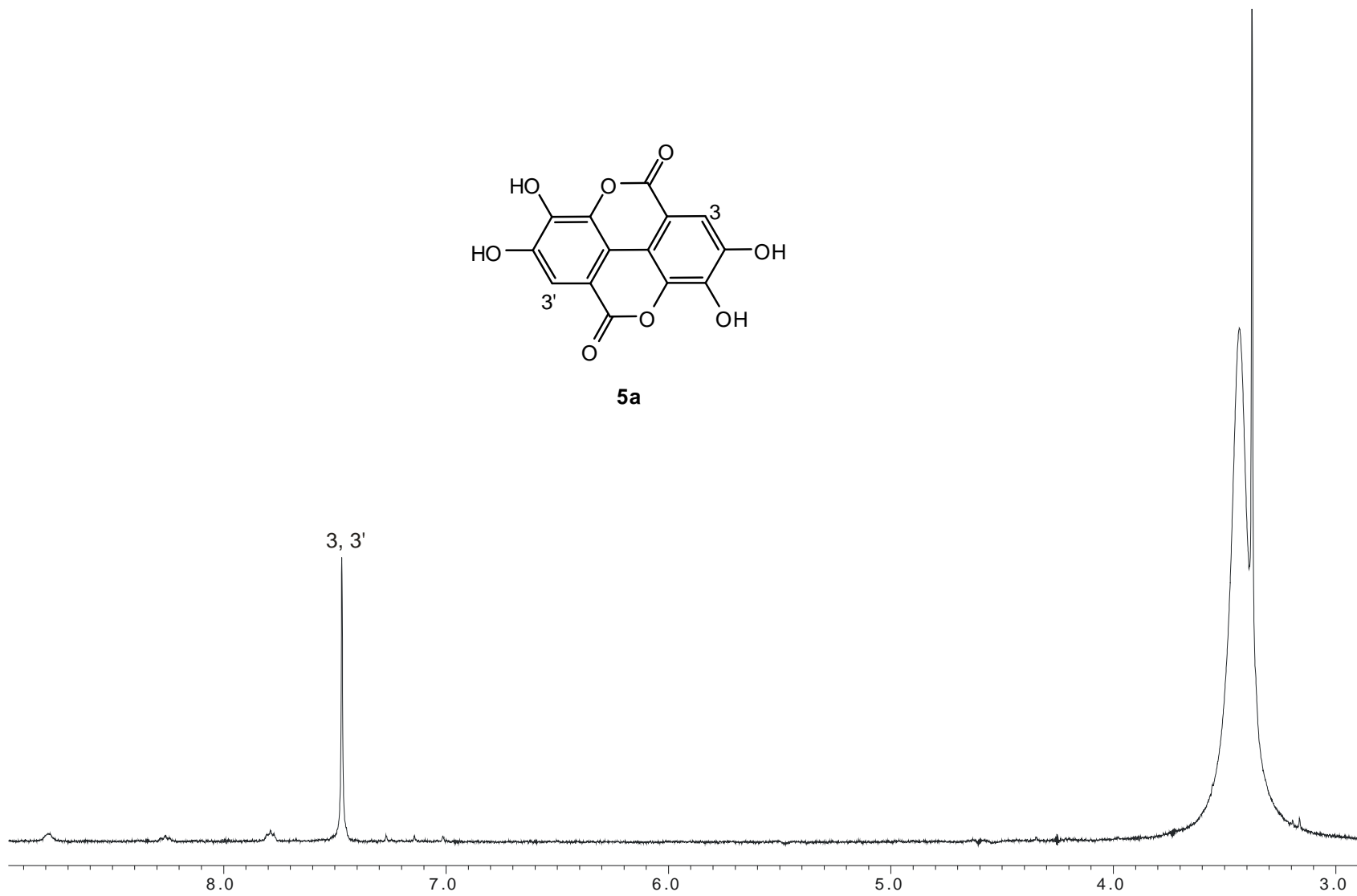
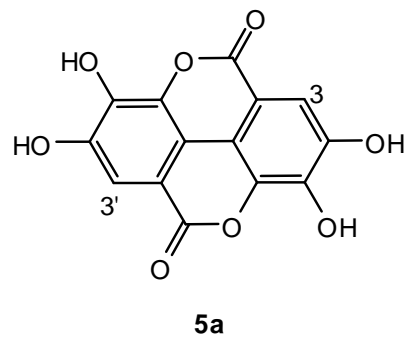


Figura 2.4.9. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) ácido elágico (5a) en $\text{DMSO-}d_6$.

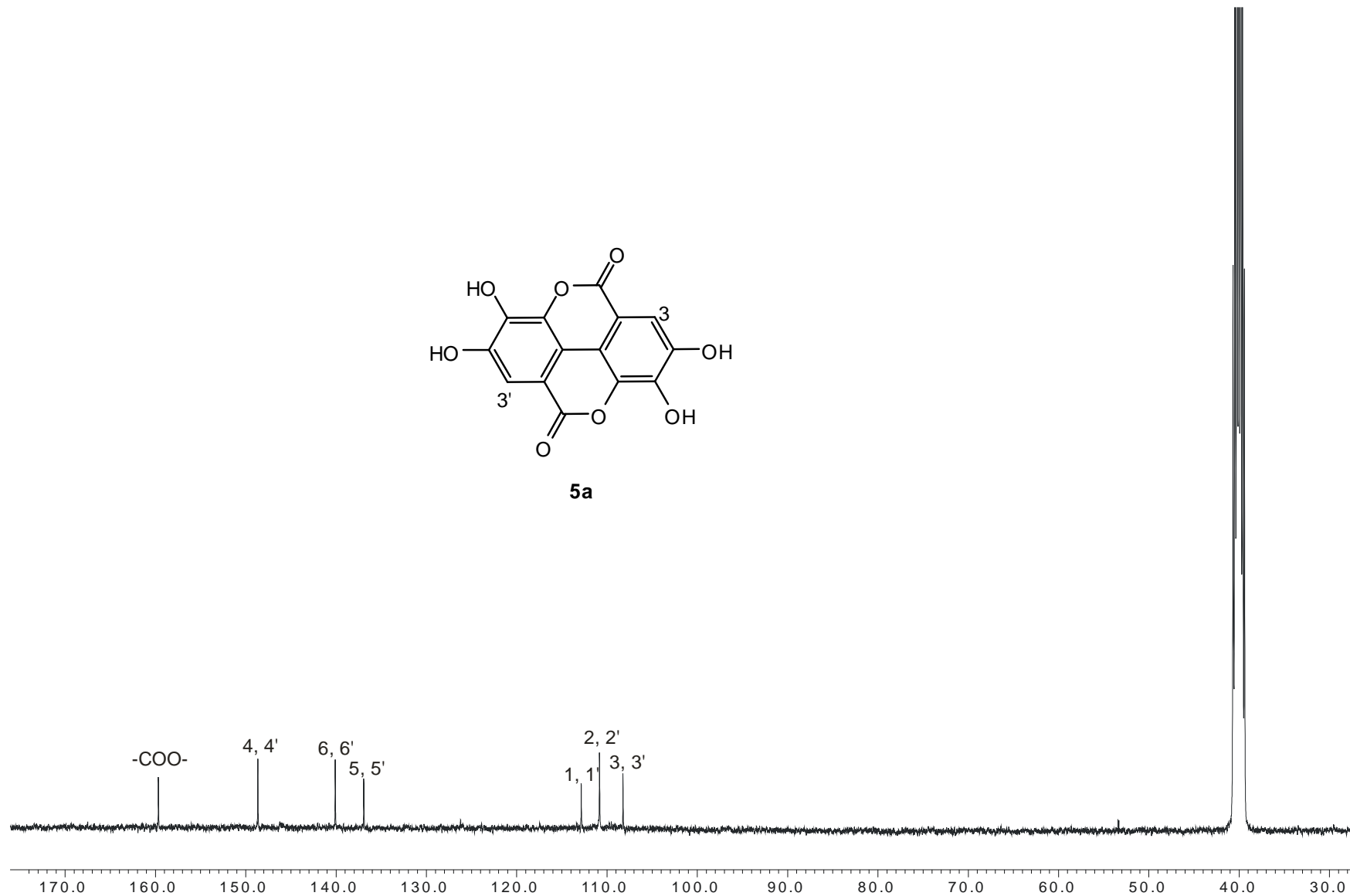
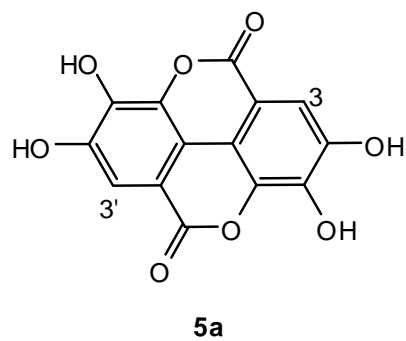
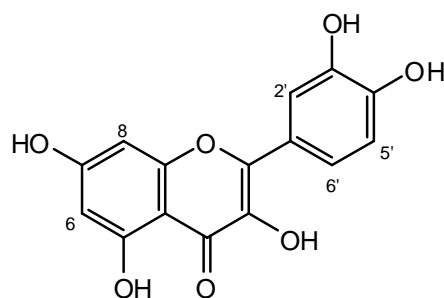


Figura 2.4.10. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) ácido eláxico (5a) en $\text{DMSO-}d_6$.

El flavonoide quercetina (**6**) es un metabolito muy conocido que se ha aislado de varias especies vegetales. Esta sustancia posee propiedades antioxidantes muy importantes y en varios casos se ha empleado como patrón en ensayos biológicos. Sus datos físicos y espectroscópicos también son conocidos. En este trabajo se obtuvo como un líquido ligeramente amarillo, el cual en su espectro de RMN de ^1H (Figura 2.4.11) se observó el siguiente conjunto de señales que son características de este compuesto. Una señal doble en 7.67 ppm con acoplamiento *meta* ($J= 1.8$ Hz) correspondiente al protón H-2', en 7.53 ppm una señal doble de dobles con acoplamientos *orto* y *meta* ($J= 8, 1.8$ Hz) debida a H-6', una señal doble en 6.87 ppm con acoplamiento *orto* ($J = 8$ Hz) para H-5', y las señales dobles en 6.16 y 6.38 ppm, con constantes de acoplamiento *meta* ($J = 1.8$ Hz) y acopladas entre sí, correspondientes a los protones H-8 y H-6, respectivamente (Tabla 2.8).



6

Tabla 2.8. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) de quercetina (**6**) en $\text{DMSO-}d_6$.

<i>H</i>	δ /ppm (<i>mult.</i> , <i>J</i> en Hz)
6	6.16 (<i>d</i> , 1.8)
8	6.38 (<i>d</i> , 1.8)
2'	7.67 (<i>d</i> , 1.8)
5'	6.87 (<i>d</i> , 8.0)
6'	7.53 (<i>dd</i> , 1.8, 8.0)

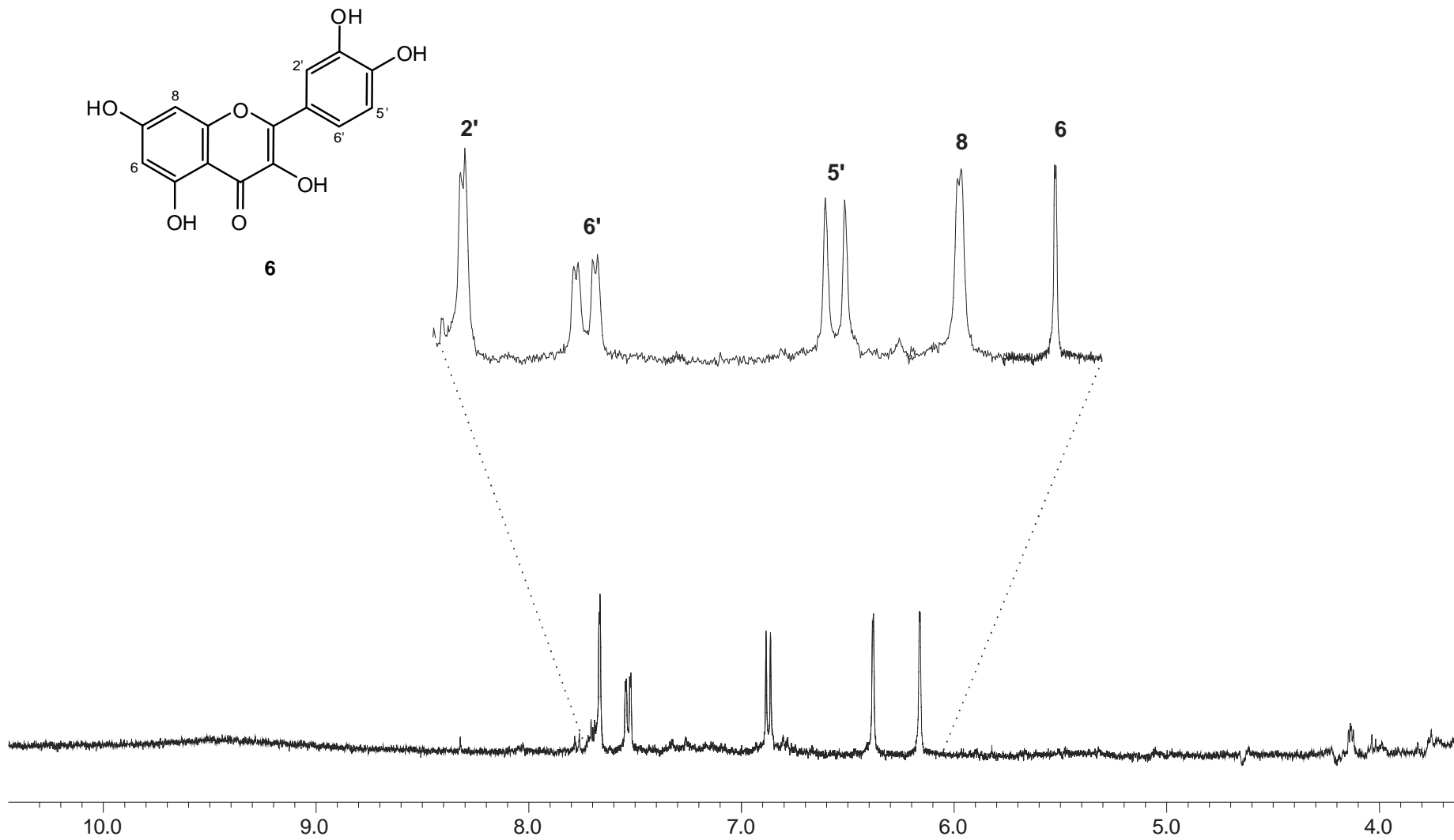
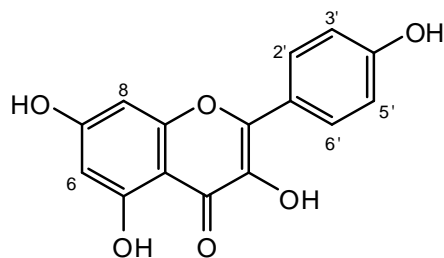


Figura 2.4.11. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de quercetina (6) en $\text{DMSO-}d_6$

El kaempferol (**7**) también es un flavonoide conocido, aunque un poco menos abundante que la quercetina. Sus datos físicos y espectroscópicos ya han sido descritos. En su espectro de RMN de ^1H (Figura 2.4.12) se apreció la señal simple en 12.50 ppm típica del hidrógeno del OH en C-5, debida al puente de hidrógeno que se forma con el oxígeno del carbonilo, en 8.05 y 6.91 ppm se observaron dos señales dobles con constantes de acoplamiento *orto* ($J = 8.0$ Hz) debidas a los protones H-2' y H-6' y a H-3' y H-5', respectivamente. H-2' y H-6', al igual que H-3' y H-5' tienen el mismo desplazamiento debido a la simetría que presenta este anillo aromático (anillo B). Finalmente, las señales correspondientes a los protones H-6 y H-8 se observaron como señales dobles con constantes características *meta* ($J = 1.8$ Hz) en 6.19 y 6.44 ppm, respectivamente (Tabla 2.9).



7

Tabla 2.9. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) del kaempferol (**7**) en $\text{DMSO}-d_6$

<i>H</i>	$\delta\text{H} / \text{ppm}$ (<i>mult</i> , <i>J</i> en Hz)
6	6.19 (<i>d</i> , 1.8)
8	6.44 (<i>d</i> , 1.8)
2'	8.05 (<i>d</i> , 8.0)
3'	6.91 (<i>d</i> , 8.0)
5'	6.91 (<i>d</i> , 8.0)
6'	8.05 (<i>d</i> , 8.0)

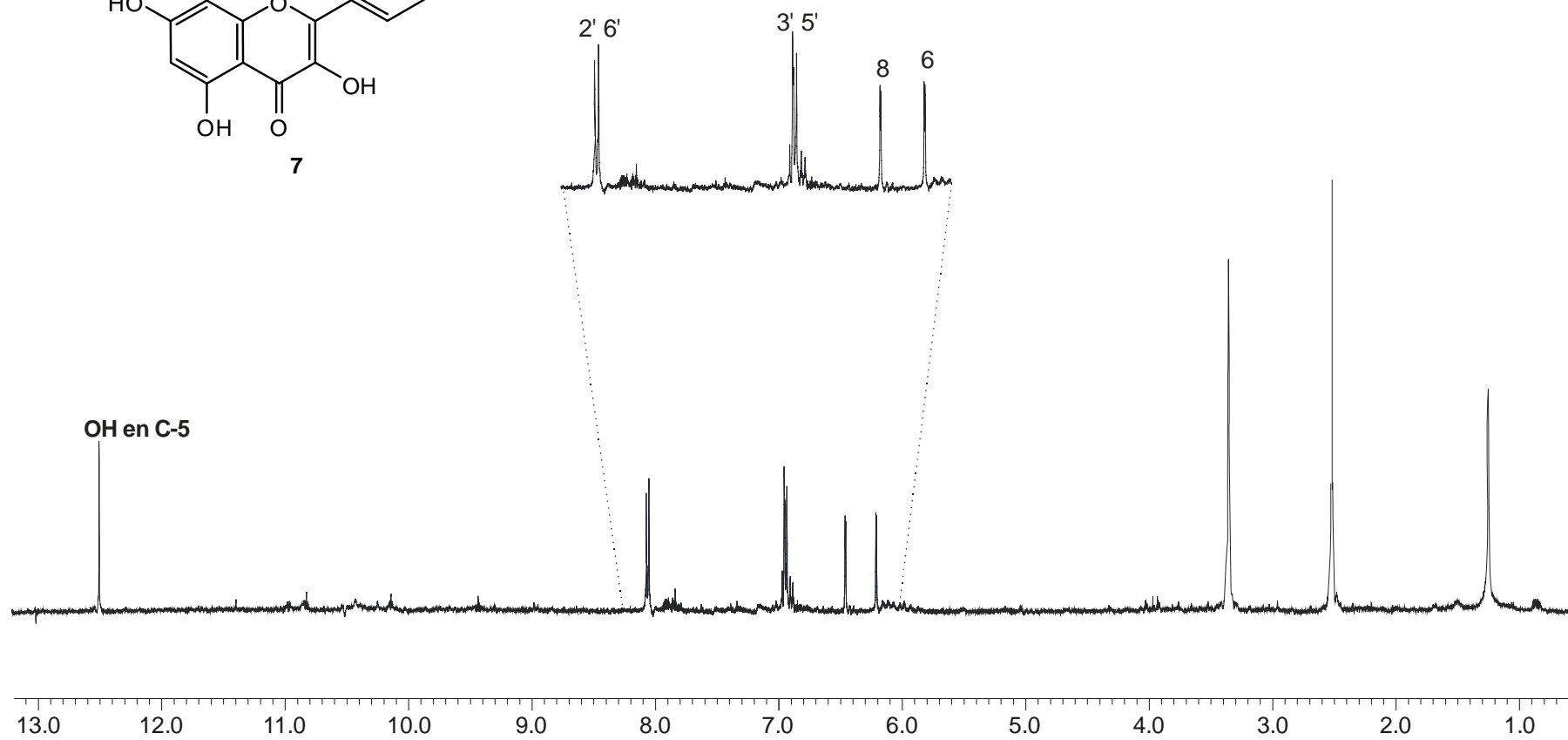
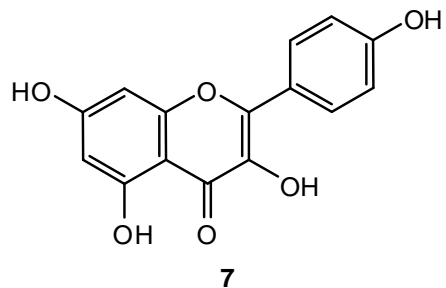
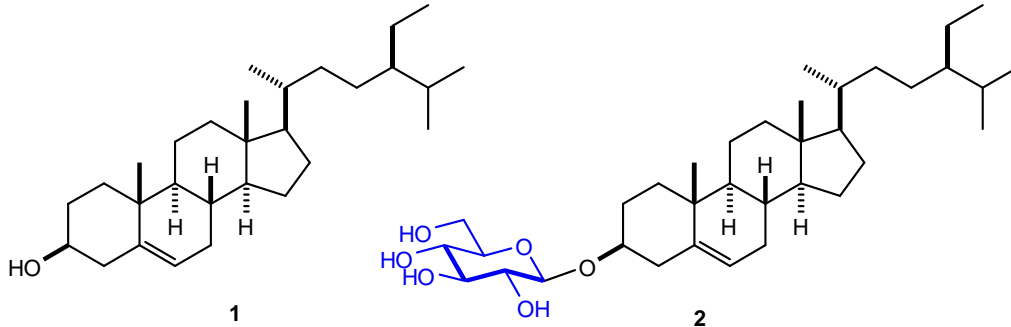


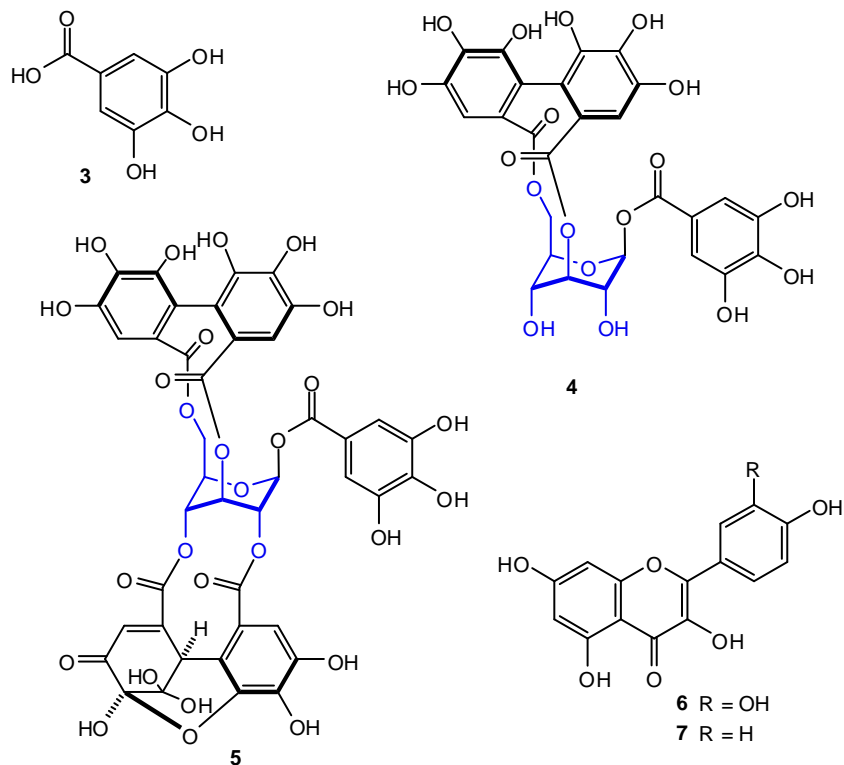
Figura 2.4.12. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de kaempferol (7) en $\text{DMSO-}d_6$

2.5 CONCLUSIONES

- ✿ Se llevó a cabo el estudio químico de los extractos hexánicos de la raíces y parte aérea de *Geranium bellum*, *Geranium seemanii* y *Geranium potentillaefolium* de donde se aislaron β -sitosterol (**1**) y 3-O- β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (**2**).



- ✿ Del extracto de AcOEt de la parte aérea de *G. potentillaefolium* se obtuvo 3-O- β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (**2**), (-)-corilagina (**3**), quercetina (**4**), ácido gálico (**5**), kaempferol (**6**) y geraniina (**7**).



- ✿ Debido a las propiedades biológicas conocidas para los compuestos aislados en este trabajo, principalmente los taninos geraniina (5) y corilagina (4), así como los flavonoides quercetina (6) y kaempferol (7), este trabajo contribuye con una metodología para el aislamiento y caracterización de sustancias naturales con potencial actividad biológica como antioxidantes y antivirales, a partir de especies de *Geranium*.

2.6 PARTE EXPERIMENTAL

La cromatografía en capa fina (CCF) se realizó en cromatofolios de aluminio recubiertos con gel de sílice 60 F254 con un espesor de 0.2 mm. Las soluciones reveladoras que se utilizaron para identificar triterpenos, taninos y flavonoides fueron: sulfato cérico (IV) amoniacal en solución de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ al 5%, FeCl_3 al 1% en MeOH y el reactivo conocido como “Natural Products - polyethyleneglycol” (NP/PEG), el cual consiste en esparcir en el cromatofolio una solución al 1% de ácido difenil borínico β -etilaminoéster en metanol (NP), seguido de una solución al 5% de polietilenglicol-4000 en etanol (PEG).

La separación cromatográfica se llevó a cabo en columnas de vidrio de 2.0 y 0.5 cm de diámetro interno usando gel de sílice marca Merck, (230-400 mesh ASTM) tamaño de partícula 0.2-0.063 mm, Sephadex LH-20 y gel de sílice C-18.

La caracterización de los compuestos se llevó a cabo principalmente mediante RMN de ^1H (400 MHz) y de ^{13}C (100 MHz), obtenidos en un espectrómetro Jeol Eclipse 400, usando los disolventes $\text{DMSO}-d_6$, CDCl_3 , piridina- d_5 y acetona- d_6 .

Colecta de especies y Obtención de extractos

G. bellum Rose, *G. potentillaefolium* DC. y *G. seemanii* Peyr. se colectaron en los meses de Junio-Agosto del 2007 y 2008 en Epazoyucan, Hidalgo. Un espécimen de cada planta se envió al Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEH para su identificación botánica por parte del 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 desengrasaron mediante precipitación con MeOH caliente-frío, filtrado y concentrado en el rotavapor.

Separación del extracto hexánico de las raíces de *Geranium bellum*

El extracto hexánico (1g) se cromatografió usando una columna cromatográfica (CC) de 2 cm de diámetro interno y 60 cm de largo, con 10 g de sílice como fase estacionaria y usando como eluyentes mezclas de Hex-AcOEt-MeOH en fracciones de 100 mL (Tabla 2.10). La muestra se adsorbió en 2 g de sílice y se aplicó en seco en la columna, eluyendo con diferentes mezclas para obtener 10 fracciones que se etiquetaron con las letras **A** a la **J**, este proceso se repitió dos veces.

Tabla 2.10. Mezclas de disolventes usadas durante la separación cromatográfica del extracto hexánico de *G. bellum*.

	<i>Cantidad de disolvente usado (mL) y fracciones obtenidas</i>									
Hex	100	90	80	70	60	50	30	20		
AcOEt		10	20	30	40	50	70	80	100	
MeOH										100
Fracción	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J

Las fracciones obtenidas se monitorearon mediante cromatografía en capa fina (CCF) usando como eluyente mezclas de Hex-AcOEt y CHCl_3 -MeOH, revelando con sulfato cérico amoniacal, como se muestra en las siguientes figuras.

Fracciones **A–D** eluyente Hex-AcOEt (8:2)



Fracciones **D–G** eluyente Hex-AcOEt (1:1).



Fracciones **G–J** eluyente CHCl_3 -MeOH (9:1).



Se pesaron las fracciones obtenidas cuyos pesos en mg se muestran en la Tabla 2.11.

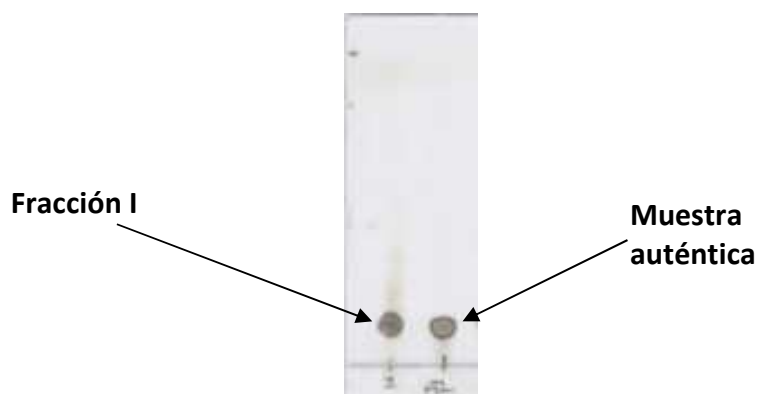
Tabla 2.11. Peso de las fracciones de las cromatografías del extracto de las raíces de *G.bellum*.

Fracción	Cromatografía 1 (mg)	Cromatografía 2 (mg)
A	75	85
B	398	405
C	197	194
D	95	98
E	67	62
F	32	48
G	28	29
H	18	15
I	22	6
J	43	15

Las fracciones **A** y **B** de la primera cromatografía, se analizaron mediante espectrometría de masa acoplado a cromatografía de gases, indicando la presencia de alcanos de cadena larga y ácidos grasos, por lo que se decidió no continuar con su separación.

En las fracciones **D–G** se apreció poca muestra, compuesta por una mezcla de varias sustancias por lo que se decidió no continuar con su separación.

La fracción **I** se comparó por CCF con una muestra auténtica de glucósido de β -sitosterol, usando como mezcla eluyente CHCl_3 -MeOH (9:1) y revelando con sulfato cérico amoniacal, como se muestra a continuación.



De esta manera se pudo conocer que la fracción **I** contenía principalmente el compuesto **(2)**.

Por otro lado, las fracciones **C** (197 mg) y **C2** (194 mg) se juntaron ya que ambas presentaron cristales al evaporarse el disolvente, los cristales fueron lavados con hexano, con lo que se obtuvieron 346 mg del compuesto **1**.

Las fracciones **H**, **H2**, **I2**, **J** y **J2** (79 mg) se unieron con base a su comparación por CCF, así como por presentar el compuesto **2**.

La fracción **I** (22 mg) de la primera columna se caracterizó de forma aislada y presentó el compuesto **2** de forma pura.

Separación del extracto hexánico de la parte aérea de *Geranium bellum*

El extracto hexánico de la parte aérea (tallos, hojas y flores) (3 g) se cromatografió usando una columna de 2 cm de diámetro interno y 60 cm de largo, con 10 g de sílice y usando como eluyente mezclas de Hex-AcOEt-MeOH-CHCl₃ colectando fracciones de 100 mL. La muestra se mezcló con 2 g de sílice gel y se aplicó en seco en la columna eluyendo con diferentes mezclas, obteniendo 10 fracciones etiquetadas de la **A** a la **J** (Tabla 2.12).

Tabla 2.12. Mezclas de disolventes usadas durante la cromatografía en columna del extracto hexánico de la parte aérea de *G. bellum*.

	<i>Cantidad de disolvente usado (mL) y fracciones obtenidas</i>									
Hex	100	90	80	70	60	50	30	20		
AcOET		10	20	30	40	50	70	80	100	
MeOH										70
CHCl ₃										30
Fracción	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J

Se pesaron las fracciones obtenidas como se muestran en la Tabla 2.13.

Tabla 2.13. Peso de las fracciones de la cromatografía del extracto hexánico de las raíces de *G. bellum*.

<i>Fracción</i>	<i>Peso (mg)</i>
A	182
B	562
C	288
D	237
E	150
F	116
G	88
H	45
I	31
J	125

La fracción **A** de la cromatografía, se sometió a una espectrometría de masa, en donde se determinó la presencia de alcanos de cadena larga y una abundancia significativa de ácidos grasos.

Las fracciones de **B–D** se compararon entre sí por CCF, revelando la aparición del compuesto **1** en la fracción **B** (562 mg).

Por último las fracciones **D-I** presentaron muy poca cantidad de compuestos, por lo que se decidió no continuar con su caracterización.

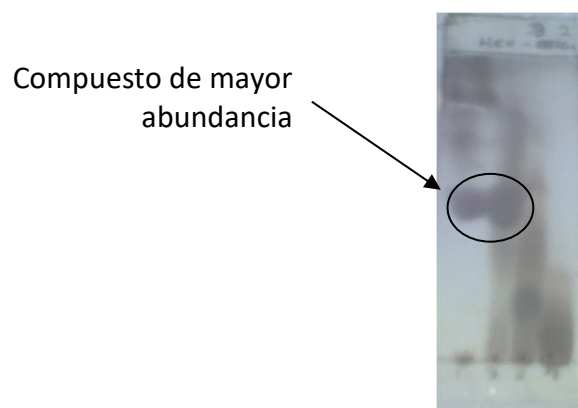
Separación del extracto hexánico de la raíces de *Geranium seemannii*

El extracto hexánico de la parte aérea (269 mg) se cromatografió usando una columna de 0.5 cm de diámetro interno y 40 cm de largo, empleando 1 g de gel de sílice y usando como eluyente mezclas de Hex-AcOEt-MeOH y colectando fracciones de 10 mL. La muestra del extracto se impregnó en 0.4 g de gel de sílice, se aplicó en seco y se eluyó de acuerdo con la Tabla 2.14.

Tabla 2.14. Mezclas de disolventes usados para la separación del extracto hexánico de las raíces de *G. seemannii*.

	<i>Cantidad de disolvente usado (mL) y fracciones obtenidas</i>									
Hex	10	9	8	7	6	5	3	2		
AcOET		1	2	3	4	5	7	8	10	
MeOH										10
Fracción	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J

Las fracciones se monitorearon mediante CCF usando como eluyente CHCl_3 -MeOH (8:2) y se reveló con sulfato cérico amoniacal, como se muestra en la siguiente imagen, en donde se analizaron las fracciones **A–D**.



Se obtuvo el peso de las fracciones obtenidas como se muestran en la Tabla 2.15.

Tabla 2.15. Peso de las fracciones de la cromatografía del extracto hexánico de las raíces de *G. seemannii*.

<i>Fracción</i>	<i>Peso (mg)</i>
A	31
B	33
C	30
D	19
E	20
F	15
G	8
H	12
I	31
J	10

Las fracciones **A** y **B** (64 mg) se juntaron con base en su comparación por CCF y se recromatografiaron en una columna de 0.5 cm de diámetro interno usando 1 g de gel de sílice y como eluyente hexano, AcOEt, CHCl₃ y MeOH (Tabla 2.16). Se colectaron 30 fracciones de 2 mL.

Tabla 2.16. Fracciones obtenidas de la fracción **A** y **B**.

	<i>Cantidad de disolvente usado (mL)</i>			
Hex	50			
AcOEt	10			
CHCl ₃	10			
MeOH	10			
Fracción	1-24	25-26	27-29	30

Las fracciones **16-24** se juntaron de acuerdo a la cromatografía en placa y se evaporaron con aire obteniéndose un polvo blanco (16 mg), el cual después de su análisis por RMN se concluyó que se trataba del compuesto **1**.

Separación del extracto hexánico de la parte aérea de *Geranium seemannii*

El extracto hexánico de la parte aérea (592 mg) se cromatografió usando una columna de 0.5 cm de diámetro interno y 40 cm de largo, con 2 g de gel de sílice como eluyente mezclas de Hex-AcOEt-MeOH en fracciones de 20 mL. La muestra se mezcló con 0.4 g de sílice y se aplicó en seco en la columna, posteriormente se eluyó con las mezclas indicadas en la Tabla 2.17, obteniendo 10 fracciones que se etiquetaron de la **A** a la **K**, cuyos pesos se muestran en la Tabla 2.18. Este proceso se repitió por segunda vez, pero con 1.24g de extracto..

Tabla 2.17. Mezclas de disolventes usados para separar el extracto hexánico de la parte aérea.

	<i>Cantidad de disolvente usado (mL) y fracciones obtenidas</i>										
Hex	20	18	16	14	12	10	6	4			
AcOEt		2	4	6	8	10	14	16	20		
CHCl ₃										18	
MeOH										2	20
Fracción	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K

Tabla 2.18. Peso de la fracciones de la cromatografía del extracto hexánico de la parte aérea del *G. seemannii*.

<i>Fracción</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Peso (mg)</i>
A	295	435
B	79	154
C	27	63
D	43	93
E	38	74
F	27	58
G	22	65
H	15	99
I	12	45
J	11	41
K	25	55

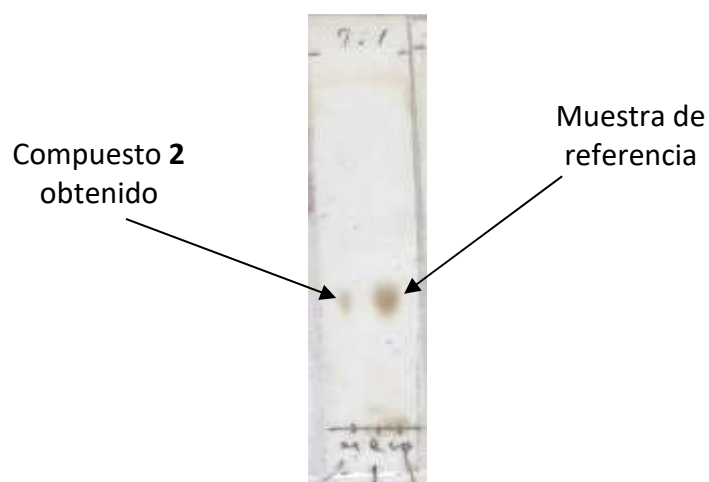
En la fracción **A** se observaron sustancias grasas por lo que se decidió no continuar su purificación, mientras que de la fracción **B** se aislaron 93 mg del compuesto **1**.

Las fracciones **I**, **I2** y **J** (74 mg) se unieron basándose en su comparación por CCF, se recromatografiaron en una columna de 0.5 cm de diámetro interno, con 350 mg de sílice y eluyendo con CHCl_3 y MeOH (Tabla 2.19). Se colectaron 58 fracciones de 2 mL.

Tabla 2.19. Mezclas de disolventes usados para separar el extracto hexánico de la parte aérea.

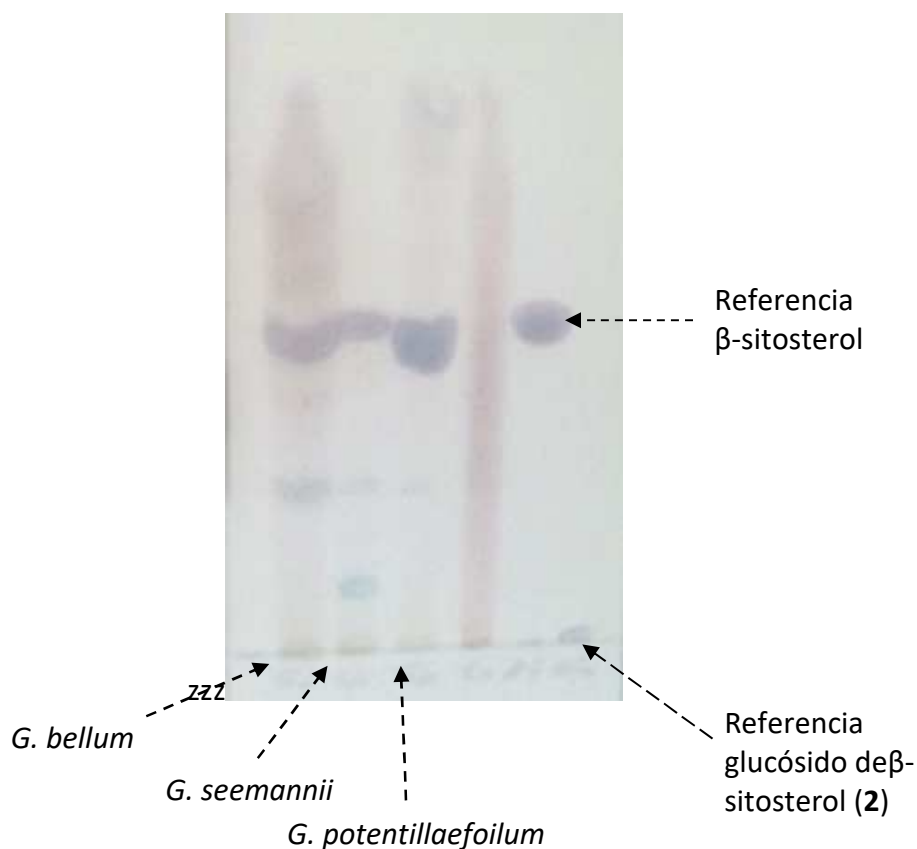
	<i>Cantidad de disolvente usado (mL)</i>		
CHCl_3	100	100	100
MeOH		1	2
Fracción	1-8	9-18	19-58

De acuerdo a CCF se junaron las fracciones **19-44** obteniendo un compuesto de color blanco y aspecto de algodón (12 mg), el se caracterizó como el glucósido de β -sitosterol (**2**), después de su análisis por RMN y comparación con una muestra auténtica obtenida en nuestro grupo de trabajo, como se muestra en la siguiente figura.



Comparación mediante cromatografía en capa fina de los extractos hexánicos de las raíces de las tres especies de *Geranium*

Los extractos hexánicos de las raíces de las tres especies estudiadas se compararon mediante CCF, en la cual se incluyeron los compuestos **1** y **2**, usando una placa de gel de sílice de 10 x 5 cm, y como eluyente hex-AcOEt (2:3). La placa se reveló con sulfato cérico amoniacal, como se puede apreciar en la siguiente figura. Esta imagen hace evidente la abundancia en los tres casos del β -sitosterol (**1**), el cual tuvo un R_f de 5.4.



Separación del extracto de acetato de etilo de la parte aérea de *Geranium potentillaefolium*

La adición de una mezcla de MeOH-H₂O (1:1, 50 mL) al extracto de AcOEt de la parte aérea (5.694 g) condujo a la obtención de una parte soluble, llamada **Fracción polar** (4.957 g) y otra parte insoluble, la cual se etiquetó como **Fracción no polar** (0.736 g). Cada parte se trató por separado.

Fracción polar

Una alícuota de la **Fracción polar** (1.993 g) se cromatografió usando una columna de 2 cm de diámetro interno y 60 cm de largo, en 50 g de Sephadex LH-20 y usando como eluyentes H₂O-MeOH y MeOH-acetona, y colectando fracciones de 200 mL. La muestra se disolvió previamente con 5 mL de una mezcla de H₂O-MeOH (1:1) y la columna se equilibró con H₂O. Posteriormente se eluyó con las mezclas que se describen en la Tabla 2.20, para obtener 12 fracciones cuyos pesos se muestran en la Tabla 2.21.

Tabla 2.20. Mezclas de disolventes usados para separar la **Fracción polar** del extracto de AcOEt de la parte aérea.

	<i>Cantidad de disolvente usado (ml) y fracciones obtenidas</i>											
H ₂ O	200	180	160	140	120	100	80	60	40			
MeOH		20	40	60	80	100	120	140	160	200	100	
acetona											100	200
Fracción	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Tabla 2.21. Peso de las fracciones de la cromatografía de la **Fracción polar** del extracto de AcOEt de la parte aérea de *G. potentillaefolium*.

<i>Fracción</i>	<i>Peso (mg)</i>
1	654
2	81
3	83
4	128
5	92
6	103
7	414
8	131
9	17
10	24
11	11
12	5

Las fracciones **2–12** se trabajaron con base en sus perfiles de CCF, usando una mezcla de CHCl₃-acetona-H₂O (1:3:0.2) y se reveló con FeCl₃ al 1% en MeOH y NP, como se muestra en las siguientes figuras.

Revelada con FeCl₃ al 1% en MeOH



Revelada con NP



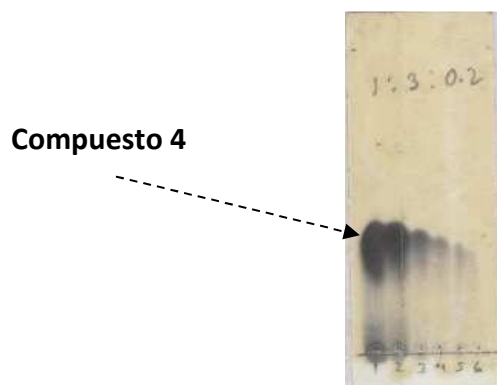
La fracción **3** (83 mg) se recromatografió en una columna de 0.5 cm de diámetro interno usando 0.5 g de gel de sílice utilizando como eluyente CHCl_3 -AcOEt-acetona-MeOH (Tabla 2.22). Se colectaron 34 fracciones de 2 mL.

Tabla 2.22. Mezcla de disolventes de la recromatografía de la fracción **3**.

	<i>Cantidad de disolvente usado (mL) y fracciones obtenidas</i>			
CHCl ₃	20	10		
AcOEt		10	20	
acetona				10
MeOH				10
Fracción	1-9	10-18	19 - 27	28 - 34

Las fracciones **20–23** de esta cromatografía se unieron con base en sus perfiles en CCF, obteniendo 30 mg del compuesto **3**.

Por otro lado, la fracción **4** (0.128g) de la cromatografía de la **Fracción polar** se purificó en una columna de 0.5 cm de diámetro interno usando 1 g de gel de sílice C-18 y H_2O -MeOH (9:1) como eluyente. Se colectaron 6 fracciones de 2 mL, a las cuales se les determinó una CCF para observar su pureza. De estas fracciones se obtuvieron 116 mg de un compuesto de color café claro, que se identificó como el compuesto **4**.



Hidrólisis de la geraniina

319 mg de la fracción 7 (obtenida una segunda cromatografía), más 299 mg de la misma fracción de la primera cromatografía (del extracto de AcOEt de *G. potentillaefolium*) se colocaron en un matraz redondo de 100 mL y se adicionaron 50 mL de H₂SO₄ al 5%, con calentamiento durante 6 horas. Posteriormente, se dejó enfriar la solución observando la formación de un precipitado, luego se filtró y se lavó con 10 mL de MeOH. El precipitado se redisolvió en piridina y se dejó en reposo con lo cual se obtuvieron cristales en forma de agujas, cuyo análisis espectroscópico y CCf comparado con una muestra auténtica, condujo a la identificación de esta sustancia como el ácido elágico (**5a**).

Por otro lado, la solución filtrada se concentró y se sometió a purificación mediante cromatografía en columna, usando gel de sílice y mezclas de CHCl₃-AcOEt (Tabla 2.23). Se colectaron 20 fracciones de 5 mL.

Tabla 2.23. Mezcla de disolventes para la purificación del compuesto **5**.

	<i>Cantidad de disolvente usado (mL)</i>	
CHCl ₃	50	25
AcOEt		25
Fracción	1-8	9-20

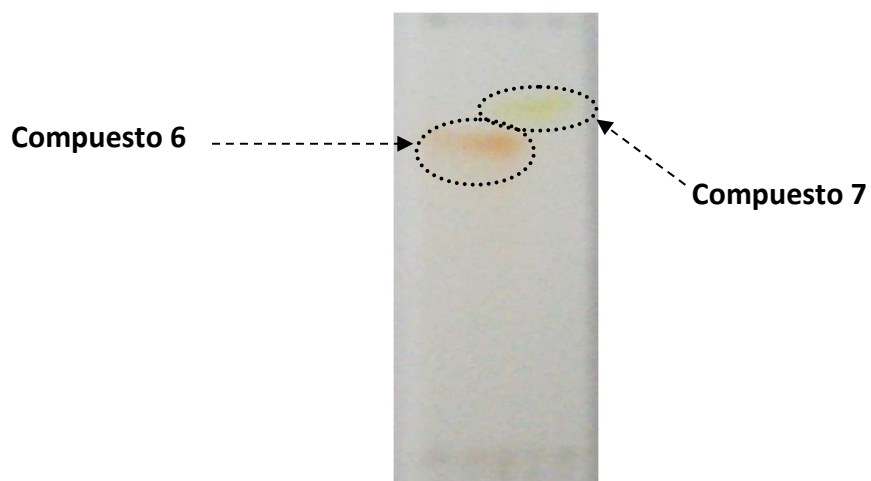
Las fracciones **13** y **14** se unieron con base en sus perfiles en CCF, obteniendo 63 mg del compuesto del ácido gálico (**5**).

La fracción **8** (131 mg) se recromatografío en una columna de 0.5 cm de diámetro interno usando 1 g de gel de sílice C-18 y como eluyentes H₂O-MeOH (Tabla 2.24). Se colectaron 48 fracciones de 2 mL.

Tabla 2.24. Mezcla de disolventes para la cromatografía de la fracción 8.

	<i>Cantidad de disolvente usado (mL) y fracciones obtenidas</i>					
H ₂ O	9	8	7	6	5	4
MeOH	1	2	3	4	5	6
Fracción	1-5	6-9	10-17	18-23	24-31	32-48

Las fracciones **34–43** (50 mg) se unieron con base en sus perfiles en CCF, se aplicaron a una placa preparativa utilizando una mezcla de CHCl₃-MeOH (9:1) y se corrió la muestra dos veces. Posteriormente, se separó la franja con R_f 0.68 (color naranja en la siguiente figura) y se extrajo con MeOH para obtener 13 mg del compuesto **6**.



Se realizó una segunda cromatografía del extracto de AcOEt de la parte aérea de *Geranium potentillaefolium* (1.5 g), en gel de sílice y usando las mezclas de los disolventes de acuerdo con la Tabla 2.25. En esta ocasión se colectaron fracciones de 300 mL, a las cuales se les analizó por CCF.

Tabla 2.25. Mezclas de disolventes usados para separar el extracto de AcOEt de la parte aérea.

	<i>Cantidad de disolvente usado (mL) y fracciones obtenidas</i>									
H ₂ O	300	270	240	210	180	150	90	60	30	
MeOH		30	60	90	120	150	210	240	270	300
acetona										
Fracción	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

La fracción **8** (103 mg) se recromatografió en una columna de 0.5 cm de diámetro interno usando 1 g de gel de sílice y utilizando como eluyente CHCl₃-MeOH (Tabla 2.26). Se colectaron 40 fracciones de 5 mL.

Tabla 2.26. Mezcla de disolventes para la recromatografía de la fracción 8.

	<i>Cantidad de disolvente usado (mL) y fracciones obtenidas</i>									
CHCl ₃	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
MeOH		0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	
Fracción	1-4	5-8	9-12	13-16	17-20	21-30	31-34	35-39	40	

La fracción conteniendo los eluaros **19–34** se unieron con base en sus perfiles en CCF, permitiendo obtener 32 mg del compuesto **7**.

Fracción no polar del extracto de acetato de etilo de la parte aérea de *Geranium potentillaefolium*

La **Fracción no polar** (1 g) del extracto de AcOEt de la parte aérea de *Geranium potentillaefolium*, se separó usando una columna de 2 cm de diámetro interno x 60 cm de largo, 10 g de gel de sílice, y Hex, CHCl₃, AcOEt, acetona y H₂O como eluyentes y colectando fracciones de 100 mL. La muestra se mezcló con 2 g de gel de sílice y se aplicó en seco en la columna. Se colectaron 12 fracciones de acuerdo con la siguiente Tabla 2.27, y se analizaron por CCF. Los pesos de estas fracciones se muestran en la Tabla 2.28.

Tabla 2.27. Mezclas de disolventes usados para separar el extracto hexánico de la parte aérea (hojas, tallos y flores).

	<i>Cantidad de disolvente usado (mL) y fracciones obtenidas</i>											
Hex	100	70	50	30								
CHCl ₃		30	50	70	100	70	50	30				
AcOEt						30	50	70	100	50		
acetona										50	100	90
H ₂ O												10
Fracción	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Tabla 2.28. Peso de la fracciones de la cromatografía de la **Fracción no polar** del extracto de AcOEt de *G. potentillaefolium*.

<i>Fracción</i>	<i>Peso (mg)</i>
1	62
2	103
3	34
4	103
5	85
6	62
7	43
8	22
9	22
10	21
11	12
12	12

La fracción **8** de esta cromatografía presentó un precipitado color café claro (22 mg) el cual se identificó mediante sus datos de RMN y comparación en CCF con una muestra original, como el glucósido de β -sitosterol (**2**).

REFERENCIAS

1. Hernández M. R., Gally J. M., "Plantas medicinales", Ed. Pax México, p. 7-8, **2000**.
2. Hoogesteger C., "Uso de plantas medicinales", Ed. Pax México, p. 9-11, **1994**.
3. Fessenden R. J., Fessenden J. S., "Química Orgánica", Ed. Iberoamericana, México, p. 771, **1983**.
4. Crag G. M., Newman D. J., "Biodiversity: A continuing source of novel drug leads", *Pure Appl. Chem.*, 77, 7-24, **2005**.
5. Esteva de S. J., "Historia de la farmacia: los medicamentos, la riqueza y el bienestar", Ed. Elsevier, España, p., 17-18, 311, **2005**.
6. Naranjo P., Crespo B., Mideros R., "Etnomedicina: Procesos italo-latinoamericanos (Memorias de IV congreso italo-latinoamericano de Etnomedicina "Felice Faontna", Quito, 6-9 de noviembre de 1995)", Ed. Abya Yala, p. 31, **1997**.
7. Hanson J. R., "Natural products: The secondary metabolites", *Ed. Royal Society of Chemistry*, p. 1-2, **2008**.
8. Kuklinski C., "Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural", Ed. Omega, Barcelona, p. 106-109, 112-116, **2000**.
9. Dewick P. M., "Medicinal Natural Products a Biosynthetic Aproach", Ed. John Wiley & Sons, New York, USA, p. 7, 151, 247, **1998**.
10. http://www.hidalgo.gob.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=40&Itemid=4. Fecha de consulta: 23 de febrero de **2009**.

11. Villavicencio N. M., Pérez E. B. E., “Plantas útiles de del Estado de Hidalgo III”, Ed. UAEH, p. 115, 227, **2006**.
12. Santiago-Méndez A., “Herbolaria y dolor”, *Revista mexicana de algología*, 3, 34-35, **2005**.
13. Delgado G., Olivares M. del S., Chávez Ma. I., Ramírez-Apan T., Linares E., Bye R., Espinosa-García F. J., “Antiinflammatory Constituents from *Heterotheca inuloides*”, *J. Nat. Prod.*, 64, 861-864, **2001**.
14. Chen Q., Kubo I., “Kinetics of Mushroom Tyrosinase Inhibition by Quercetin”, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4108-4112, **2002**.
15. Stipanovic R. D., Puckhaber L. S., Reibenspies J. H., Williams H. J., “The absolute configuration of (-)-3-hydroxy-a-calacorene”, *Phytochemistry* 67, 1304–1308, **2006**.
16. Romero-Montiel L. P., “Estudio químico de las raíces de *Stevia eupatoria* (Spreng) willd, Tesis de licenciatura, UAEH, **2005**.
17. Pérez-Pérez I., “Metabolitos secundarios, aislados de las raíces y las hojas de *Stevia jorullensis* H. B. K.”, Tesis de licenciatura, UAEH, **2006**.
18. Sánchez-Areolo E., “Estudio Químico de *Stevia serrata*, *Stevia porphyrea* y *Stevia connata*”, Tesis docotral, CINVESYAV-IPN, **1999**.
19. Villavicencio N. M., Pérez E. B. E., Ramírez A. A., “Plantas útiles de del Estado de Hidalgo”, Ed. UAEH, p. 54, **1995**.
20. Villavicencio N. M., Pérez E. B. E., Ramírez A. A., “Plantas útiles de del Estado de Hidalgo II”, Ed. UAEH, p. 70, 100, 104, 112, 154, **2002**.

21. Psotova J., Svobodova A., Kolarova H., Walterova D., "Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes", *J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 84, 167–174, **2006**.
22. Jirovský D., Kosina P., Myslíňová M., Stýskala J., Ulrichová J., Šimének V., "HPLC Analysis of Rosmarinic Acid in Feed Enriched with Aerial Parts of *Prunella vulgaris* and Its Metabolites in Pig Plasma Using Dual-Channel Coulometric Detection", *J. Agric. Food Chem.*, 55, 7631–7637, **2007**.
23. Jolad S. D., Hoffmann J. J., Torrance S. J., Wiedhopf R. M., Cole J. R., Arora S. K., Bates R. B., Gargiulo R. L., Krieklb G. R., "Bouvardin and Deoxybouvardin, Antitumor Cyclic Hexapeptides from *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae)", *J. Am. Chem. S.*, 99, 8040-8044, **1977**.
24. León-Villanueva G. I., "Estudio químico de *Conyza schiedeana* y determinación de la actividad antibacteriana de *Conyza schiedeana*, *Gnaphalium liebmannii* y *Verbena menthaefolia* Benth", Tesis de licenciatura, UAEH, **2000**.
25. Seeram N. P., Adams L. S., Zhang Y., Lee R., Sand D., Scheuller H. S., Heber D., "Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells In Vitro", *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9329-9339, **2006**.
26. Hager T. J., Howard L. R., Liyanage R., Lay J. O., Prior R. L., "Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS", *J. Agric. Food Chem.*, 56, 661-669, **2008**.
27. Ikeda Y., Fujii Y., Nakaya I., Yamazaki M., "Quantitative HPLC analysis of cardiac glycosides in *Digitalis purpurea* leaves", *J. Nat. Prod.*, 58, 897-901, **1995**.
28. Zhou M., Doherty G. A., "De novo approach to 2-deoxy- β -glycosides: Asymmetric syntheses of digoxose and digitoxin", *J. Org. Chem.*, 72, 2485-2493, **2007**.

29. Wélé A.,*, Zhang Y, Brouard J., Pousset J., Bodo B., “Two cyclopeptides from the seeds of *Annona cherimola*”, *Phytochemistry*, 66, 2376–2380, **2005**.
30. Wélé A., Ndoye I., Zhang Y., Brouard J., Bodo B., “Cherimolacyclopeptide D, a novel cycloheptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*”, *Phytochemistry*, 66, 693–696, **2005**.
31. Kim D.H., Ma E.S., Suk K.D., Son J.K., Lee J.S., Woo M.H. “Annomolin and Annocherimolin, New Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona cherimolia* Seeds”, *J. Nat. Prod.* 64, 502–506, **2001**.
32. Alonso G. M., “Biotecnología aplicada a la mejora de “Pelargonium””, Tesis doctoral, Univesidad Complutense de Madrid, España, p. 8, **2002**.
33. Villavicencio N. M., Pérez E. B. E., Ramírez A. A., “Lista florística del Estado de Hidalgo: Recopilación bibliográfica”, Ed. UAEH, p. 54, **1998**.
34. Pamplona R. J. D., “Salud por las plantas medicinales/Healty Plants”, Ed. Safeliz, p. 63, **2006**.
35. Miliuskas G., Van Beek T. A., Venskutonii P. R., Linssen J. P. H., Waard de P., “Antioxidante, activity of *Geranium macrorrhizum*”, *Eur. And Food res. And Tech.*, 218, 253-261, **2004**.
36. Serkedjieva J., Ivancheva S., “Antiviral effects of extracts from *Geranium Sanguineum L.*”, 2nd, *Int. Electronic Conf. on Synthetic Organic Chem.*, **1998**.
37. Amaral S., Mira L., Nageura J. M. F., Pereira de S. A., Florencio M. H., “Plant extracts with anti-inflammatory properties – A new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships”, *Bioorg. & Med. Chem.*, 17, 1876-1883, **2009**.

38. Amabeoku G. J., "Antidiarrhoeal activity activity of *Geranium Incanum* Burm. F. (Geraniaceae) leaf aqueous extract in mice", *J. of Ethno. Pharm.*, en impresión, **2009**.
39. Li J., Huang H., Feng M., Zhou W., Shi X., Zhou P., "In vitro and vivo anti-hepatitis B virus activities of a plant extract from *Geranium carolianum* L.", *Antiviral Res.*, 79, 114-120, **2008**.
40. Okuda T., Yoshida T., Hatano T., "Constituents of *Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc. Part 12. Hydrated Stereostructure and Equilibration of Geraniin", *J. C. S. Perkin*, 9-14, **1982**.
41. Lin S., Wang C., Lu Y., Wu W., Hou W., "Antioxidant, anti-semicarbazide-sensitive amine oxidase, and anti-hypertensive activities of geraniin isolated from *Phyllanthus urinaria*", *Food and Chem. Tox.*, 46, 2485-2492, **2008**.
42. Yang C., Cheng H., Lin T., Chiang L., Lin C., "The in vitro activity of geraniin and 1,3,4,6-tetra-O-galloyl- β -d-glucose isolated from *Phyllanthus urinaria* against herpes simplex virus type 1 and type 2 infection", *J. of Ethno.*, 110, 555-558, **2007**.
43. Luger P., Weber M., Kashino S., Amakura Y., Yoshida T., Okuda T., Beurskens G., Dauter Z., "Structure of the Tannin Geraniin Based on Conventional X-ray Data at 295 K and on Synchrotron Data at 293 and 120 K", *Acta Cryst.*, B54, 687-694, **1998**.
44. Yamada H., Nagao K., Dokei K., Kasai Y., Michihata N., "Total Synthesis of (-)-Corilagin", *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 7566-7567, **2008**.
45. Zhao L., Zhang S., Tao J., Pang R., Jin F., Guo Y., Dong J., Ye P., Zhao Z., Zheng G., "Preliminary exploration on anti-inflammatory mechanism of Corilagin (beta-1-O-galloyl-3,6-(R)-hexahydroxydiphenoyl-d-glucose) in vitro", *Int. Immunopharmacol.*, 8, 1059-1064, **2008**.

46. Kinoshita S., Inoue Y., Nakama S., Ichiba T., Aniya Y., "Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa Island and its tannin corilagin ", *Phytomedicine*, 14, 755-762, **2007**.
47. Calzada F., Meckes M., Cedillo-Rivera R., Tapia-Contreras A., Mata R., "Screening of mexican medicinal plants for Antiprotozoal activity", *Pharm. Biol.*, 36, 305-309, **1998**.
48. Calzada F., Cerda-Garcia-Rojas C. M., Meckes M., Cedillo-Rivera R., Bye R., Mata R., "Geranins A and B. New antiprotozoal A-Type proanthocyanidins from *Geranium niveum*", *J. Nat. Prod.*, 62, 705-709, **1999**.
49. Calzada F., Cedillo-Rivera R., Bye R., Mata R., " Geranins C and D, additional new antiprotozoal A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum*", *Planta Médica*, 67, 677-680, **2001**.
50. Andersen Ø. M., Viksund R. J., Pedersen A. T., "Malvidin 3-O-(6-O-acetilglucoside)-5-glucoside and other anthocyanins from flowers of *Geranium sylvaticum*", *Phytochemistry*, 38, 1513-1517, **1995**.
51. Shim J., Lim K., "Anti-oxidative and anti-proliferative character of glycoprotein isolated from *Geranium sibiricum* linne in Chang liver cells", *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 26, 320-324, **2008**.
52. Camacho-Luis A., Gayosso-De-Lucio J. A., Torres-Valencia J. M., Muñoz-Sánchez J. L., Alarcón-Hernández E., López R., Barrón B. L., "Antioxidant constituents of *Geranium bellum* Rose", *J. Mex. Chem. Soc.*, 52, 103-107, **2008**.
53. Shaheen F., Muhammad A., Rubeena S., Irfanullah., Sarah B., "Spectral assignments and reference data", *Magn. Reson. Chem.*, 39, 399-405, **2001**.

54. Juei-tang C., Feng-lin H, "Tannin derivatives and their use for treatment of hypertension", *United States Patent*, 5266319, **1993**.
55. Yoshida, T., Okuda, T., "¹³C nuclear magnetic resonance spectra of corilagin and geraniin", *Heterocycles*, 14, 1743-1749, **1980**.
56. Tanaka N., Shimonura K., Ishimaru K., "Ellagic acid formation galloylglucoses by a crude enzyme of *Cornus capitata* adventitious roots", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 1869-1871, **2001**.