

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

“Estudio químico del extracto metanólico de hojas de *Crataegus rosei* y desarrollo de un sistema automicroemulsionante elaborado a partir de este extracto, con efectos vasodilatador y antihipertensivo”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctora en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

M. en C. Diana López Fitz

Dirigida por:
Dr. Mamadou Moustapha Bah

Codirigida por:
Dr. Carlos Tomas Quirino Barreda

Centro Universitario, Querétaro, Qro. a junio de 2025

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



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

“Estudio químico del extracto metanólico de hojas de *Crataegus rosei* y desarrollo de un sistema automicroemulsionante a partir de este extracto, con efectos vasodilatador y antihipertensivo”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctora en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

M. en C. Diana López Fitz

Dirigida por:

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Codirigida por:

Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda

Dr. Mamadou Moustapha Bah
Presidente

Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda
Secretario

Dr. César Ibarra Alvarado
Sinodal

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Sinodal

Dr. José Alejandro García Arredondo
Vocal

Centro Universitario, Querétaro, Qro., a junio de 2025

RESUMEN

La hipertensión arterial es el principal factor de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades cardiovasculares, que constituyen las principales causas de muerte a nivel mundial. De los antihipertensivos alópatas, muchos tienen baja eficacia, efectos adversos y son de baja accesibilidad para la mayoría de los pacientes. En cambio, por su amplia disponibilidad, bajo costo, reducidos efectos secundarios, las plantas medicinales representan una alternativa para tratar dichas patologías, ya sea proporcionando nuevos fármacos, o como remedios herbolarios. Entre estos últimos, se encuentran los extractos estandarizados Li 132 y WS 1442, derivados de hojas y flores de plantas del género *Crataegus* y actualmente comercializados en Europa para tratar la hipertensión y la insuficiencia cardíaca. Quince de esas especies, entre ellas *C. rosei*, son endémicas de México. Demostramos que el extracto metanólico de las hojas de esta especie (EMCr) produce un potente efecto vasodilatador en aorta aislada de rata. La presente investigación se enfocó en llevar a cabo el estudio químico de dicho extracto para seleccionar marcadores químicos y farmacológicos idóneos y obtener un extracto estandarizado. Se seleccionaron los ácidos ursólico y euscáfico, los cuales fueron cuantificados mediante HPLC-UV. Se determinó la miscibilidad acuosa del extracto con aditivos lipídicos a 25 y 37 °C, permitiendo desarrollar un sistema automicroemulsionante (SAME-Cr) a partir del extracto cuantificado, para facilitar su administración oral y biodisponibilidad en ratas. El SAME-Cr se elaboró utilizando diagramas de fase ternarios y se caracterizó, determinándose su capacidad de carga (solubilidad) del extracto, así como sus propiedades fisicoquímicas, su estabilidad física y química y su toxicidad aguda y subaguda. Finalmente, se determinó la actividad antihipertensiva del SAME-Cr y del EM-Cr en ratas con hipertensión inducida con L-NAME, dando como resultado la regresión de la presión arterial a valores normales en ambos casos, siendo más potente el SAME-Cr. El estudio histopatológico de los órganos y los parámetros sanguíneos de los animales tratados con el SAME-Cr no mostró ninguna alteración. Por lo tanto, el SAME-Cr es un candidato para continuar con los ensayos preclínicos y clínicos y desarrollar un fitomedicamento de extracto de *C. rosei* para tratar la hipertensión.

Palabras clave: Hipertensión, *Crataegus rosei*, marcador químico y farmacológico, microemulsión, actividad antihipertensiva

ABSTRACT

Hypertension is the main risk factor for the development of cardiovascular diseases, which are the main cause of death worldwide, and in Mexico. Most antihypertensive drugs have low efficacy, adverse effects, and are of low accessibility for most patients. By contrast, due to their wide availability, low cost, reduced side effects, and high content of secondary metabolites, medicinal plants represent an alternative for treating such pathologies, either by providing new drugs, or as herbal medicines. Li 132 and WS 1442, obtained from the leaves and flowers of *Crataegus* plant species, are among the most phytopharmaceutical commercial drugs currently in use for the treatment of hypertension and heart failure. Fifteen out of these species, *C. rosei* among them, are endemic to Mexico. Our group has demonstrated the potent vasorelaxant activity of the methanol extract (MECr) obtained from its leaves on isolated rat aortic rings. The current research focused first on performing the chemical study of this extract, in order to select its most suitable chemical and pharmacological markers, and to obtain a standardized extract. Therefore, ursolic and euscaphic acids were selected and quantified in the MECr. Then, the aqueous miscibility of the MECr with lipidic additives at 25 and 37 °C was determined, which allowed the development of a self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) containing the quantified extract, to facilitate its oral administration and bioavailability to rats. This system was elaborated using ternary phase diagrams. Besides, its capacity to solubilize the MECr, as well as its physicochemical properties, its physical and chemical stability, and its acute and subacute toxicities were evaluated. Finally, the antihypertensive activities of the SMEDDS and the MECr were assessed on L-NAME-induced hypertensive rats. Blood pressure in both cases returned to normal values, SMEDDS exhibiting the most potent activity. Histopathological study of the SMEDDS-treated animal organs and blood parameters examination did not reveal any alteration. Therefore, this SMEDDS is a new candidate to pursuing the preclinical and clinical assays for the development of a phytopharmaceutical drug to treat arterial hypertension.

Keywords: Hypertension, *Crataegus roei*, chemical and pharmacological marker, microemulsion, antihypertensive activity

“No hay compuesto que no se pueda separar teniendo las condiciones analíticas adecuadas”

Diana López Fitz

DEDICATORIA

Con mucho cariño a mis queridos padres, quienes guían mi camino, aconsejan y apoyan cada paso que doy. Quienes me motivaron y apoyaron emocional en este proceso de mi formación académica y como persona desde niña. Sobre todo, por su amor y cariño incondicional que me dan. Siempre recuerdo tus palabras mamá “tu puedes Diana, eres una campeona no te rindas y no dejes lo que gusta”. También, tus palabras papá “los científicos estamos locos”.

A mi querida hermana, quien ha sido mi gemela y ejemplo a seguir desde pequeña. Quien me ayudó a caminar, a crecer en la vida y me dio la fortaleza que necesitaba para estudiar lo que me apasionaba, en un lugar alejado de casa. Quien me apoya incondicional y emocionalmente, porque me da su amistad, cariño y sobre todo por cuidar de mi desde que nací.

“Ustedes tres son mi mayor admiración e inspiración en la vida”

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, ahora SECIHTI, por la beca otorgada durante cuatro años de mi doctorado.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Posgrado en Ciencias Químicas Biológicas por la infraestructura y la formación académica otorgada.

Al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría de la UAQ (FOPER-2021-FQU02449) y al Fondo de “Químicas Somos Todos”, en modalidad de Proyectos estudiantiles (**FOPES-OFIC.234/2023**) y al Fondo para el Fortalecimiento de la Investigación, Vinculación y Extensión (FONFIVE) con clave **FQU202408**, por los financiamientos otorgados para realizar y concluir este proyecto.

A la empresa Lyontec Químicos por la donación de los excipientes lípidicos para el desarrollo del sistema automicroemulsionante.

Al D. en C. Moustapha Bah por aceptarme en su grupo de investigación y darme la oportunidad de prepararme, crecer y de aprender de usted. Le agradezco por la paciencia que me ha tenido hasta el día de hoy en mi formación como investigadora y persona. Siempre estaré muy agradecida por creer en mí y por darme la confianza para desarrollar este proyecto. Gracias por compartir sus experiencias en productos naturales, lo cual hizo que me apasionará por las técnicas cromatográficas, y en especial de HPLC. Siempre estaré eternamente agradecida con usted.

Al D. en C. Carlos Tomás Quirino Barreda por aceptar el cargo de codirector de mi proyecto y por recibirme de estancia en su laboratorio de Farmacia Molecular y liberación controlada de la UAM-Xochimilco. Por el tiempo, asesorías y los conocimientos que me transmitió en la parte de tecnología farmacéutica. Le agradezco por todo el apoyo y atención que recibí de su parte. Gracias por hacer posible el desarrollo de la forma farmacéutica.

A mis sinodales por el tiempo dedicado a este proyecto, por los comentarios y sugerencias que enriquecieron mi proyecto de investigación y por sus cuestionamientos que me hicieron crecer como investigadora.

Al D. en C. Eloy Rodríguez de León por los espectros de los compuestos purificados. Por transmitirme sus conocimientos, especialmente en HPLC y en RMN. Lo que he aprendido se debe a las enseñanzas que me brindó, siempre estaré agradecida por su asesoramiento constante desde la maestría.

A la D. en C. Ericka de los Rios Arellano por su valioso apoyo en los estudios histológicos. Por compartir conmigo todos sus conocimientos y enriquecer mi proyecto. Le agradezco a usted, a la Ing. Ma. Lourdes Palma Tirado y a la Dra. Elsa Nydia Hernández pertenecientes a la Unidad de Histología y Microscopía-UNAM

campus Juriquilla por su apoyo y enseñanzas en el uso de todas las técnicas microscópicas. Les agradezco sobre todo por la confianza brindada.

Al D. en C Daniel Godínez Hernández por recibirme a mí y a mis 60 ratitas con los brazos abiertos y en toda disposición de sumar y enriquecer el proyecto. Por todo el apoyo y su asesoría en el efecto antihipertensivo. Le agradezco a su grupo de trabajo del IIQB-UMSNH y en especial a la M.V.Z. Madeline Hernández por siempre velar por la salud de mis ratitas y por todo su apoyo incondicional, por último, al M. en C. Luíz Ángel Quiroz García, por su amistad y el gran apoyo y conocimiento que me brindó en la parte experimental de mi proyecto durante mi estancia.

A la D. en C. Leticia García por siempre estar en disposición de ayudarme, por el apoyo brindado en los estudios farmacológicos y sobre todo por su valiosa amistad.

A la D. en C Valeria Espíndola por su apoyo y acompañamiento en mi estancia en la UAM-Xochimilco, por sus aportaciones en el desarrollo de la forma farmacéutica. Estoy muy agradecida por la amistad de me brindaste desde el primer día y que se ha ido fortaleciendo hasta el día de hoy. Gracias por preocuparte por mí, amiga.

A la M. en C. Rebeca Rodríguez por la confianza, el apoyo y animó incondicional que me brindó durante el desarrollo de este proyecto. Por todo el apoyo en el cuidado de mis ratitas, por la valiosa amistad, risas y alegrías que me das. Eres una pieza muy valiosa en nuestro equipo de trabajo Rebe. Gracias por todo.

A la M. en C. Odette Flores por el apoyo, preocupación y animó que me das siempre, por tu amistad incondicional. Por escuchar y compartirme tu manera especial de ver las cosas. Gracias por sumar para que esto se hiciera posible “chinitos”.

A la M. en C. Victoria Ruiz por el apoyo incondicional que me brindas. El conocimiento que aportas y sumas a mi crecimiento, por el apoyo que le diste a mi proyecto, especialmente en las asesorías del estudio de toxicidad. Por la valiosa amistad que me das y por escucharme y aconsejarme en cada momento.

A las Q.F.B Sandi Izazaga y Kena Pérez, por su valiosa amistad y apoyo desinteresado en el ámbito personal y académico. Les agradezco por estar conmigo, escuchar y sacarme una sonrisa cuando más lo necesito. Gracias por sumar a este proyecto.

A mis tíos y primos por todo el cariño, el apoyo, motivación y confianza que me dan. A mis abuelitas Lucia y Alicia por enseñarme su forma de amar y cuidar a través de las plantas medicinales. Continuar con su legado hace que me sienta más cerca de ustedes. Asimismo, agradezco a mis tíos Rafael y Reyna por todo el apoyo y palabras de motivación y sobre todo por recibirme en su casa cuando me iba de estancia a la Cdmx. Gracias a todos por hacer esto posible.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación titulada “**Estudio químico del extracto metanólico de hojas de *Crataegus rosei* y desarrollo de un sistema automicroemulsionante elaborado a partir de este extracto, con efectos vasodilatador y antihipertensivo**” fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A T E N T A M E N T E

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

M. en C. Diana López Fitz

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ABREVIATURAS	xv
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Sistema circulatorio	3
2.1.1 Estructura de los vasos sanguíneos	4
2.1.1.1 Túnica adventicia	4
2.1.1.2 Túnica media	5
2.1.1.3 Túnica íntima	5
2.2 Factores relajantes derivados del endotelio	5
2.2.1 Vías de señalización	5
2.2.2 Óxido nítrico (NO)	7
2.2.3 Prostaciclina (PGI ₂)	7
2.2.4 Sulfuro de hidrógeno (H ₂ S)	8
2.3 Importancia de las enfermedades cardiovasculares	8
2.4 Hipertensión	10
2.4.1 Descripción	10
2.4.2 Tratamiento de la hipertensión	12
2.4.2.1 Alfabloqueantes	12
2.4.2.2 Betabloqueantes	13
2.4.2.3 Antagonistas de los canales de Ca ²⁺	14
2.4.2.4 Diuréticos	14
2.4.2.5 Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs)	15
2.4.2.6 Antagonistas de los receptores de angiotensina II	15
2.5 Plantas medicinales en el tratamiento de enfermedades	17
2.5.1 Importancia medicinal	17
2.5.2 Género <i>Crataegus</i>	18
2.5.2.1 Taxonomía del género <i>Crataegus</i>	18
2.5.2.2 Uso tradicional del Género <i>Crataegus</i>	20
2.5.2.3 Compuestos químicos predominantes en el género <i>Crataegus</i>	21
2.5.2.3.1 Flavonoides	22
2.5.2.3.2 Proantocianidinas (taninos condensados)	23
2.5.2.3.3 Triterpenos	24
2.5.2.4 Efectos farmacológicos de los metabolitos secundarios identificados en <i>C. rosei</i>	27
2.6 Medicamentos a base de plantas	28
2.7 Control de calidad de los fitomedicamentos	29

2.8 Extractos cuantificados y estandarizados.....	32
2.8.1 Remedios herbolarios de <i>Crataegus</i> y fitomedicamentos.....	34
2.8.1.1 Propiedades farmacológicas y mecanismo de acción del extracto WS 1442.....	35
2.9 Sistemas lipídicos como formas farmacéuticas de administración	35
2.9.1 Sistemas lipídicos	35
2.9.2 Microemulsiones	36
2.9.2.1 Importancia de las microemulsiones.....	36
2.9.2.2 Propiedades importantes de las microemulsiones.....	37
2.9.2.2.1 Estabilidad y tamaño de partícula de las microemulsiones...	37
2.9.2.2.2 Potencial Zeta.....	38
2.9.2.2.3 Índice de refracción.....	39
2.9.2.2.4 Valor de pH.....	39
3 JUSTIFICACIÓN.....	40
4 HIPÓTESIS.....	42
5 OBJETIVOS.....	42
5.1 General.....	42
5.2 Específicos.....	42
6 METODOLOGÍA.....	43
6.1 Obtención del extracto.....	43
6.2 Estudio químico del extracto metanólico	43
6.2.1 Identificación de compuestos fenólicos en el MECr crudo mediante UPLC-DAD-ESIMS.....	43
6.2.2 Fraccionamiento del EMCr.....	44
6.2.3 Desarrollo del método analítico por medio de HPLC-DAD.....	44
6.2.4 Purificación mediante HPLC.....	45
6.2.5 Identificación de los compuestos purificados.....	45
6.2.6 Cuantificación de los ácidos triterpénicos identificados.....	45
6.2.7 Validación del método analítico para la detección y cuantificación del ácido euscáfico (AE) y ácido ursólico (AU) en el extracto.....	46
6.2.7.1 Adecuabilidad.....	46
6.2.7.2 Linealidad.....	47
6.2.7.3 Límite de detección y límite de cuantificación.....	47
6.2.7.4 Incertidumbre (o precisión)	48
6.2.7.5 Repetibilidad	48
6.2.7.6 Robustez	48
6.3 Desarrollo del sistema automicroemulsionante	48
6.3.1 Estudio de solubilidad del extracto metanólico de <i>C. rosei</i>	48
6.3.2 Construcción de diagrama ternario.....	49
6.3.3 Prueba de autoemulsificación	49
6.3.4 Caracterización de las formulaciones	50
6.3.5 Optimización	50
6.3.6 Estudios de estabilidad física.....	50
6.3.7 Estudios de estabilidad acelerada de las formulaciones.....	50

6.4 Estudios <i>in vivo</i>	51
6.4.1 Animales de experimentación.....	51
6.4.2 Estudios de toxicidad aguda y subaguda.....	51
6.4.2.1 Estudio de toxicidad oral aguda por medio de la directriz 423 de la OCDE.....	51
6.4.2.2 Estudio de toxicidad subaguda por medio de la directriz 407 de la OCDE.....	52
6.4.3 Evaluación de la actividad antihipertensiva del EMCr y del SMEDDS-Cr.....	52
6.4.4 Sacrificio de los animales.....	53
6.4.5 Reactividad vascular.....	53
6.5 Análisis estadístico.....	54
7 Resultados y discusión.....	55
7.1 Determinación del metanol residual del EMCr por GC-MS.....	55
7.2 Análisis del EMCr por medio de LC-MS.....	55
7.3 Desarrollo del método analítico para la cuantificación de ácidos triterpénicos.....	56
7.4 Purificación de los ácidos triterpénicos eluidos del EMCr	57
7.5 Identificación de los ácidos triterpénicos del EMCr mediante RMN.....	59
7.6 Identificación de los ácidos triterpénicos en el EMCr.....	63
7.7 Cuantificación de los ácidos triterpénicos.....	64
7.8 Validación del método analítico para la cuantificación del AE y AU en el EMCr y SAME.....	68
7.8.1 Especificidad.....	68
7.8.2 Adecuabilidad y precisión del sistema analítico.....	69
7.8.3 Linealidad, límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) del sistema analítico.....	69
7.8.4 Precisión del método.....	70
7.8.5 Exactitud.....	71
7.8.6 Robustez.....	71
7.9 Desarrollo de un sistema automicroemulsificable del EMCr.....	73
7.9.1 Pruebas de solubilidad del EMCr en diferentes excipientes.....	73
7.9.2 Construcción del diagrama ternario.....	74
7.9.3 Caracterización de las muestras de SAME obtenidas con el diseño reticular simple aumentado.....	75
7.9.3.1 Prueba de autoemulsificación.....	75
7.9.3.2 Determinación del pH, índice de refracción (IdR), tamaño de gota (TG) y potencial Z de los sistemas lipídicos.....	76
7.9.4 Optimización y caracterización de los sistemas lipídicos (M11-M20).....	77
7.9.5 Estudio de estabilidad física y estudio de emulsificación a pH= 1.2 y pH= 6.8.....	78

7.9.6 Estabilidad acelerada.....	79
7.10 Estudio de toxicidad.....	82
7.10.1 Estudio de toxicidad aguda.....	82
7.10.2 Estudio de toxicidad subaguda.....	84
7.10.2.1 Parámetros de química sanguínea y biometría hemática.....	84
7.10.2.2 Análisis de los órganos principales.....	86
7.11 Efecto antihipertensivo del extracto metanólico y del SMEDDS-Cr.....	91
7.12 Resultados de la reactividad vascular.....	95
8 CONCLUSIONES.....	97
9 SUGERENCIAS.....	98
10 REFERENCIAS.....	99
11 ANEXO.....	117
12 PUBLICACIONES.....	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura histológica de los vasos sanguíneos.....	4
2	Vías de señalización de los factores derivados del endotelio.....	6
3	Las diez principales causas de muerte en el mundo en 2021.....	9
4	Defunciones por enfermedades cardiovasculares.....	10
5	Regulación de la presión arterial.....	11
6	Distribución geográfica de la especie <i>Crataegus rosei</i> en México.....	20
7	Estructuras de los flavonoides identificados en el género <i>Crataegus</i>	23
8	Estructuras de algunas procianidinas encontradas en las especies del género <i>Crataegus</i>	25
9	Estructuras de los triterpenos identificados en especies del género <i>Crataegus</i>	26
10	Parámetro de estandarización para medicamentos herbolarios.....	33
11	Cromatograma de HPLC-DAD preparativo de una fracción del EMCr rica en ácidos triterpénicos.....	58
12	Cromatogramas individual de los ácidos triterpénicos del EMCr purificados por HPLC-DAD preparativo.....	59
13a	Espectros comparativos de RMN de ¹ H (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) de los ácidos ursólico, corosólico y euscáfico (a), así como los espectros de los ácidos oleanólico y maslínico (b).....	60
13b	Espectros comparativos de RMN de ¹ H (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) de los ácidos ursólico, corosólico y euscáfico (a), así como los espectros de los ácidos oleanólico y maslínico (b).....	61
14	Espectros comparativos de RMN de ¹³ C (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) de los ácidos ursólico, corosólico y euscáfico (a), así como los espectros de los ácidos oleanólico y maslínico (b).....	62
15	Cromatograma a nivel preparativo de los tiempos de retención y sus correspondientes compuestos	63
16	Cromatogramas A) de los estándares de los ácidos triterpénicos [AE], [AM], [AC], [AO] y [AU] respectivamente, y B) del EMCr con las estructuras químicas de los mismos compuestos.....	65
17	A) Cromatograma del análisis de las curvas de calibración B) curvas de calibración de los estándares de los ácidos triterpénicos.....	66
18	Gráfica de la cuantificación de los ácidos triterpénicos en el EMCr.....	68

19	Gráfica de las concentraciones obtenidas de las variaciones del método analítico.....	73
20	Diagrama ternario que muestra las proporciones de los aditivos lipídicos anfifílicos utilizados para integrar las formulaciones M1 a M10 que fueron evaluadas (caracterizadas) en su capacidad de formar un SAME.....	75
21	A) Diagrama ternario con gráfica de contorno de muestra, B) gráfica de superficie.....	78
22	Imágenes capturadas de la MET de las gotas del SAME-Cr.....	80
23	Gráficas de los diferentes resultados de estabilidad acelerada, A) Tamaño de gota, B) Potencial Z, C) Índice de refracción, D) Infrarrojo, E) Color y F) Viscosidad.....	81
24	Gráfica del peso corporal de los animales tratados con la concentración de 300, 2000 mg/kg pc y el grupo control.....	82
25	Porcentaje de peso corporal de A) Machos y B) Hembras...	85
26	Gráficas de los resultados del diámetro de los glomérulos, áreas del glomérulo, hepatocito y de las gotas lipídicas.....	89
27	Imágenes representativas de la histología del riñón, hígado y bazo.....	90
28	Imágenes representativas de la histología del cerebro, pulmón y corazón.....	91
29	Resultados de la medición de la presión arterial sistólica y diastólica.....	92
30	Curva concentración-respuesta del carbacol en los diferentes tratamientos.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Clasificación de los valores de presión arterial.....	12
2	Efectos secundarios de los grupos de fármacos antihipertensivos.....	16
3	Gradiente de elución para el análisis de compuestos fenólicos y flavonoides.....	44
4	Ácidos fenólicos identificados en el EMCr	56
5	Flavonoides identificados en el EMCr.....	57
6	Ecuaciones lineales deducidas de las curvas de calibración, límite de detección y cuantificación.....	67
7	Parámetros de desempeño del AE y AU y criterios de aceptación.....	69
8	Resultado de la precisión del EA y UA.....	70
9	Valores de los % de RSD obtenidos del análisis por dos analistas en dos días diferentes.....	71
10	Resultados porcentaje (%) de recobro del AE y AU al utilizar el método analítico por HPLC.....	72
11	Resultados del ensayo de la robustez del método por HPLC, medida como variaciones expresadas en % RSD, de la respuesta en concentración de los analitos AE y AU ante modificaciones de condiciones analíticas.....	72
12	Resultados de solubilidad del extracto metanólico y de los marcadores químicos a temperatura ambiente ($\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	74
13	Resultados de la estabilidad cinética de las formulaciones...	79
14	Parámetros de química sanguínea del estudio de toxicidad..	83
15	Parámetros de química sanguínea del estudio de toxicidad subaguda en las ratas macho.....	87
16	Parámetros de química sanguínea del estudio de toxicidad subaguda en las ratas hembras.....	88
17	Resultados de la medición de la presión arterial sistólica.....	93
18	Resultados de la medición de la presión arterial diastólica.....	94
19	E_{\max} de los diferentes tratamientos en los experimentos de determinación del efecto antihipertensivo	96

ABREVIATURAS

AF: Fosfatasa alcalina
Akt: Proteína quinasa B
ALT: Alanina aminotransferasa
AST: Aspartato Aminotransferasa
CE₅₀: Concentración efectiva media
CSE: Cistationina γ -liasa
CV: Coeficiente de variación
DL₅₀: Dosis letal media
ECA: Enzima convertidora de angiotensina
ECV: Enfermedades cardiovasculares
EMA: **E**uropean **M**edicines **A**gency (Agencia Europea del Medicamento)
E_{max}: Efecto máximo
EMCr: Extracto metanólico de *Crataegus rosei*
eNOS: Enzima óxido nítrico sintasa endotelial
GC: Guanilato ciclasa
GMPc: Monofosfato de guanosina cíclico
GTP: Trifosfato de guanosina
H₂S: Sulfuro de hidrógeno
HDL: Lipoproteínas de alta densidad
HPLC-UV: Sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a detector de ultravioleta-visible
HTA: Hipertensión arterial
IECAs: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía
LC: Límite de cuantificación
LC-MS: Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas
LD: Límites de detección
LDL: Lipoproteína de baja densidad
L-NAME: N ω -nitro-L-arginina metil éster
MET: Microscopía Electrónica de Transmisión
MLCK: Cadena ligera de miosina
NO: Óxido nítrico
OMS: Organización Mundial de la Salud
PGH₂: Prostaglandina H₂
PGI₂: Prostaciclina
PKA: Proteína quinasa A
RMN: Resonancia magnética nuclear
RSD: Desviación estándar relativa
SAME-Cr: Sistema Auto-Micro-Emulsionante de *Crataegus rosei*
SERCA2a: ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico
SMEDDS: Self-Micro Emulsifying Drug Delivery System
VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad
 ζ : Potencial Z

1. INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades no transmisibles que aquejan actualmente a la humanidad, se encuentran en primer lugar las cardiovasculares (ECV), las cuales pueden desarrollarse como consecuencia de factores modificables y no modificables. Los no modificables incluyen la edad y el sexo. Por su parte, los factores modificables engloban el sedentarismo, la ingesta elevada de grasas saturadas y trans, el consumo excesivo de sodio y alcohol, así como el tabaquismo, todos los cuales propician el desarrollo de patologías, como la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia y la diabetes mellitus (Hernández-Escolar y col., 2010).

En particular, la persistencia de la hipertensión conduce al desarrollo de otras ECV, como las cerebrovasculares, las isquémicas, la angina de pecho, el infarto, etc. (Kjeldsen, 2018; Fuchs y Whelton, 2020). Existen diversos fármacos para tratar la hipertensión. Sin embargo, estos tienen eficacia limitada y acarrear efectos adversos, además de ser de acceso limitado para la mayoría de los pacientes (Peraza-Zaldívar y col., 2019).

El uso tradicional de las plantas medicinales, a las cuales recurre la mayoría de la población mundial, no sólo para las enfermedades antes señaladas, sino para la mayoría de los padecimientos, constituye una alternativa a los medicamentos alopáticos actuales (Scossa y col., 2018). Las plantas del género *Crataegus* han constituido desde varios siglos el recurso principal para tratar las ECV en los países donde crecen.

De acuerdo con lo descrito por los botánicos, los miembros del género *Crataegus* son de una gran complejidad taxonómica, lo cual ha dificultado, o retardado, la identificación correcta de varios de sus miembros, limitando de esta forma sus estudios farmacológicos y químicos. Los extractos acuosos e hidroalcohólicos de dichas plantas se consumen de manera tradicional con fines curativos (Núñez-Colín y Hernández-Martínez, 2011; Nabavi y col., 2015).

Al respecto, en las últimas décadas, se han obtenido extractos estandarizados y remedios herbolarios del género *Crataegus* que han sido registrados y comercializados en Europa como medicamentos o preparados de medicina tradicional a base de plantas y, de conformidad de los últimos datos sobre su monografía de la EMA (2025), se han utilizado con relativa eficacia y gran seguridad, asiendo énfasis en la necesidad de su uso con la supervisión médica.

México alberga alrededor de 15 especies de *Crataegus* identificadas, las cuales cuentan con muy pocos estudios químicos y farmacológicos (Núñez-Colín y col., 2008). Es en ese marco que se planteó en este proyecto el estudio químico y etnofarmacológico de un extracto metanólico de *Crataegus rosei*, una de las especies mexicanas, con la finalidad de explorar su potencial antihipertensivo. Dado que la actividad farmacológica depende del perfil químico del extracto, se llevó a cabo un estudio exhaustivo de sus metabolitos secundarios para poder escoger entre ellos, uno o más marcadores químicos y farmacológicos idóneos entre ellos. Posteriormente, se desarrolló un sistema automicroemulsionable (SAME-Cr) a partir de su extracto metanólico, el cual se caracterizó física y fisicoquímicamente de modo que normativamente constituyera un extracto estandarizado susceptible de dosificarse en una forma farmacéutica para su administración oral. Finalmente, se determinó la actividad antihipertensiva, así como la toxicidad tanto del extracto metanólico como del estandarizado. Los resultados de estos experimentos proporcionaron suficientes datos para considerar al SAME-Cr con potencial uso como medicamento herbolario útil para el tratamiento de la hipertensión arterial.

2. ANTECEDENTES

2.1 Sistema circulatorio

El sistema circulatorio cuenta con tres funciones principales: transporte, regulación y protección. Este sistema participa en el transporte de todas las sustancias esenciales para el metabolismo celular, como por ejemplo los productos de la digestión que son absorbidos a través de la pared intestinal hacia los vasos sanguíneos y linfáticos, los desechos metabólicos como la urea, agua y otras moléculas que el cuerpo no necesita (para ser excretados) y las células como los eritrocitos que transportan el oxígeno hacia los tejidos. Adicionalmente, dicho sistema contribuye a la regulación de la temperatura y de los procesos hormonales, mediante la desviación de la sangre de vasos cutáneos más profundos hacia vasos superficiales y a través del transporte de hormonas en la sangre, respectivamente. Además, el sistema circulatorio participa en la protección contra la pérdida de sangre por lesión, mediante mecanismos de coagulación y también protege contra agentes patógenos por medio de la función inmunitaria producida por los leucocitos. Este sistema se divide en sistema linfático y cardiovascular (Stuart, 2013; Taylor y Bordoni, 2021).

El sistema cardiovascular se compone del corazón y de los vasos sanguíneos. La función del corazón es bombear la sangre con la presión necesaria para impulsarla a través de los vasos sanguíneos y así transportarla hacia los tejidos. Los vasos sanguíneos se clasifican en venas, arterias y capilares, los cuales forman la red cardiovascular que comienza en las salidas del corazón, recorre todo el cuerpo y regresa a las principales entradas del corazón (Moore, 2013). Esta red transporta glóbulos, nutrientes, oxígeno y agentes farmacológicos a los tejidos. También eliminan subproductos celulares, dióxido de carbono y sustancias químicas tóxicas (Taylor y Bordoni, 2021).

2.1.1 Estructura de los vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos se forman por tres capas: la túnica adventicia, la túnica media y la túnica íntima (Figura 1).

Estas estructuras están delimitadas por membranas. Entre la túnica íntima y la media, se encuentra la membrana limitante interna y la membrana limitante externa separa la túnica media de la adventicia (Eble y Niland, 2009).

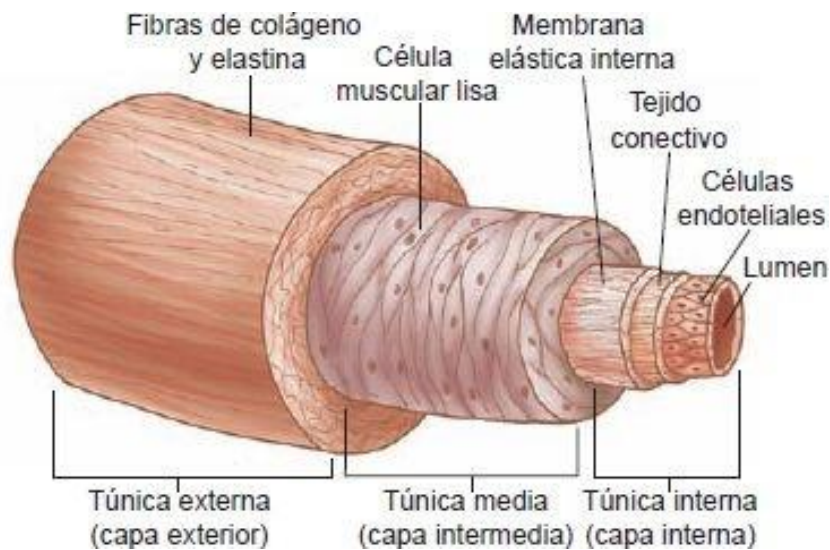


Figura 1. Estructura histológica de los vasos sanguíneos (Eble y Niland, 2009).

2.1.1.1 La túnica adventicia

La túnica adventicia es una capa que recubre los vasos sanguíneos y se encuentra en la parte más externa de los vasos sanguíneos. Esta capa se compone de fibras elásticas y de colágeno, fibroblastos, terminaciones nerviosas, una red de pequeños vasos sanguíneos y algunas veces macrófagos. El grosor de la adventicia varía de acuerdo con el grosor del vaso. En venas de mediano y gran tamaño, constituye del 60 al 70 % de la pared. La función de esta túnica es facilitar la comunicación entre las diferentes capas, mediar la formación de microvasos que nutren las capas internas, controlar el remodelado arterial, albergar células del sistema inmune y contribuir en la reparación de las paredes arteriales (Eble y Niland, 2009; Cabrera-Fischer y col., 2015).

2.1.1.2 Túnica media

La túnica media se localiza entre la túnica adventicia y la íntima del vaso sanguíneo; se compone de células musculares lisas y de tejido conectivo. En esta capa, las células musculares lisas intervienen en la regulación de la vasoconstricción y vasodilatación. La vasoconstricción puede activarse mediante presión o estiramiento del tejido muscular y a través de la unión de un ligando a su receptor en la superficie celular. Esto conduce a un aumento en la concentración de calcio intracelular, ya sea por la liberación de reservas internas o por la apertura de los canales de calcio (Cabrera, 2008; Zhao y col., 2015).

2.1.1.3 Túnica íntima

La túnica íntima es la capa más interna de los vasos sanguíneos. Está compuesta por células endoteliales ancladas a una lámina basal de 80 nm de espesor. La capa de células endoteliales recubre toda la red vascular, desde el corazón, hasta los capilares más pequeños. La lámina basal sirve de andamio para los vasos sanguíneos, contiene proteínas y enzimas necesarias para la angiogénesis y la plasticidad de los vasos sanguíneos (Félétou, 2011). En esta túnica íntima, se sintetizan y liberan los factores relajantes de los vasos sanguíneos.

2.2 Factores relajantes derivados de endotelio

2.2.1 Vías de señalización

El endotelio juega un papel esencial en la modulación del tono vascular mediante la síntesis y liberación de factores relajantes y constrictores derivados de endotelio. Estos factores y las respectivas vías de señalización se muestran en la Figura 2. Los vasodilatadores incluyen las prostaglandinas (PG), el óxido nítrico (NO) y factores hiperpolarizantes derivados de endotelio (EDH). La vasodilatación dependiente de endotelio se basa principalmente en la regulación del diámetro del vaso sanguíneo mediante el equilibrio de estos factores relajantes de endotelio. El NO modula de manera importante el tono de los vasos sanguíneos grandes. Su concentración disminuye a medida que disminuye el diámetro del vaso y la

concentración de los EDH aumenta a medida que disminuye el tamaño del vaso (Shimokawa y Godo, 2016).

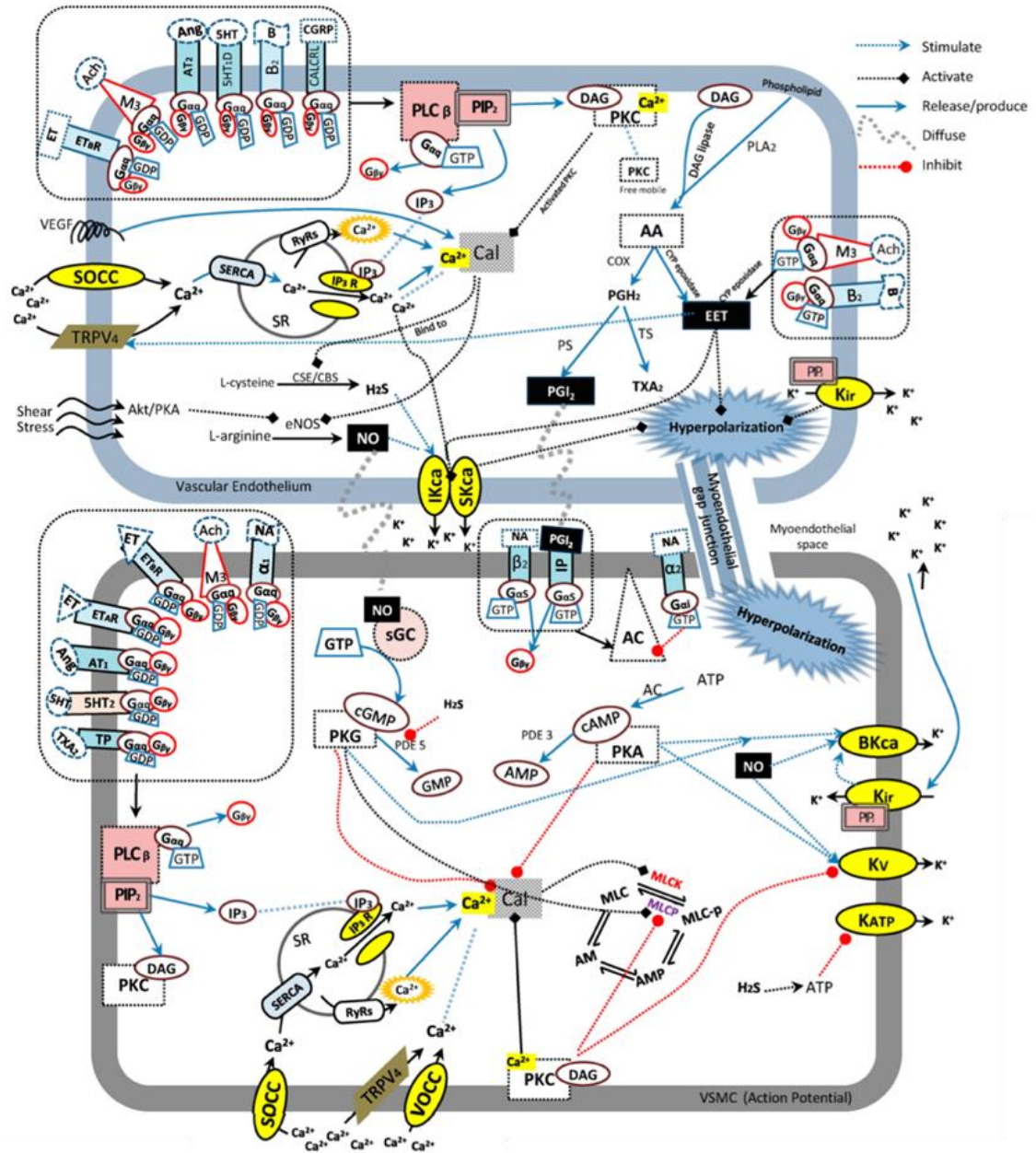


Figura 2. Vías de señalización de los factores derivados del endotelio (Loh y col., 2018). Ach: acetilcolina, M3: receptores muscarínicos 3, PLC: Fosfolipasa C, Cal: calmodulina, eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial, NO: óxido nítrico, sGC: guanilato ciclasa soluble, GTP: guanosín trifosfato, cGMP: guanosín monofosfato cíclico, PKG: proteína quinasa C, Kv: canales de potasio dependientes de voltaje.

2.2.2 Óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico es sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) en el endotelio vascular. Esta enzima puede ser activada de manera dependiente e independiente de calcio. La dependiente es inducida por neurotransmisores como la acetilcolina, la bradicinina y la histamina que, al unirse a sus receptores específicos, son activados, promoviendo el aumento de la concentración de calcio. Este calcio se une a la calmodulina y el complejo calcio-calmodulina activa a la eNOS. Mientras que la independiente es estimulada en respuesta al estrés y a algunas hormonas que desencadenan la vía de señalización de la proteína quinasa A (PKA) y la proteína quinasa B (AKT), las cuales activan a la eNOS mediante su fosforilación en los sitios de activación: Ser1177, Ser635 y Ser1179. El NO sintetizado en el endotelio se difunde al músculo liso vascular activando la guanilato ciclasa (GC); esta convierte el trifosfato de guanosina (GTP) en monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). El aumento de GMPc activa a la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) y esta proteína fosforila los canales de calcio, dando como resultado una disminución de este ión. Por otro lado, la PKG fosforila y activa a la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) que, a su vez, desfosforila la cadena ligera de miosina y por consecuencia, impide la formación de los puentes cruzados entre las cabezas de miosina y los filamentos de actina y, por lo tanto, inhibe la contracción (Zhao y col., 2015).

2.2.3 Prostaciclina (PGI₂)

La prostaciclina es sintetizada en el endotelio a partir de su precursor, el ácido araquidónico, el cual se encuentra en la bicapa de la membrana plasmática. Este ácido es liberado hacia el citosol, donde es convertido en prostaglandina H₂ (PGH₂) por la enzima ciclooxygenasa (COX). La prostaciclina sintasa es la encargada de catalizar la conversión de PGH₂ a PGI₂, la cual se difunde al músculo liso vascular y se une a su receptor (receptor acoplado a proteínas Gs), que a su vez induce la activación de la adenilato ciclasa y, por consecuencia, aumenta la concentración de

AMPC. El incremento de AMPc intracelular activa a la PKA que desencadena la vasodilatación (Loh y col., 2018).

2.2.4 Sulfuro de hidrógeno (H₂S)

El H₂S es un gasotransmisor que se clasifica como factor hiperpolarizante derivado del endotelio. La síntesis de este gasotransmisor es catalizada por la enzima cistationina β-sintasa (CBS) y/o la cistationina γ-liasa (CSE) a partir de L-cisteína. En el endotelio, el H₂S activa los canales IK_{ca} y SK_{ca}, produciendo una hiperpolarización. En el músculo liso, el H₂S inhibe la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5) que impide la degradación del GMPc. También, inhibe la unión de ATP a los canales de K_{ATP}, permitiendo la salida de K⁺, que da como resultado la hiperpolarización de la membrana. Estos mecanismos conducen a la vasodilatación (Wang, 2009; Loh y col., 2018).

2.3 Importancia de las enfermedades cardiovasculares

Las ECV engloban al conjunto de alteraciones del corazón y de los vasos sanguíneos (OMS, 2021). Se pueden clasificar en: hipertensión arterial (presión arterial alta), cardiopatía coronaria (infarto de miocardio), enfermedad cerebrovascular (apoplejía), enfermedad vascular periférica, insuficiencia cardíaca, cardiopatía reumática, cardiopatía congénita y miocardiopatías. En conjunto, esas enfermedades constituyen actualmente la principal causa de muerte en México y en el mundo (Arques, 2018; INEGI, 2025).

Las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) registraron que, de los 68 millones de defunciones reportadas en 2021, la principales causas de muertes en el mundo se debieron a la cardiopatía isquémica, el COVID y los accidentes cerebrovasculares. De estas tres, las dos relacionadas con el sistema circulatorio sumaron 15.9 millones de defunciones (Figura 3). Estas dos enfermedades también se han registrado como las principales causas de muerte durante los últimos 15 años (OMS, 2024).



Figura 3. Las diez principales causas de muerte en el mundo en 2021 (adaptado de la OMS, 2024).

Los datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, México) reportaron que las enfermedades cardiovasculares han sido la principal causa de muerte en México por varios años. De enero a septiembre del 2024, el INEGI registró 610,404 defunciones, de las cuales, 144,925 fueron a causa de las ECV, posicionándolas como la principal causa de muerte (INEGI, 2025). En el año 2023, de las defunciones ocasionadas por enfermedades del corazón, se registraron en primer lugar las enfermedades isquémicas, que representaron el 75.5 %, seguidas por las hipertensivas (14.6 %), las relacionadas con la circulación pulmonar y otras enfermedades del corazón y la fiebre reumática aguda, y las enfermedades cardíacas reumáticas crónicas (Figura 4) (INEGI, 2023).

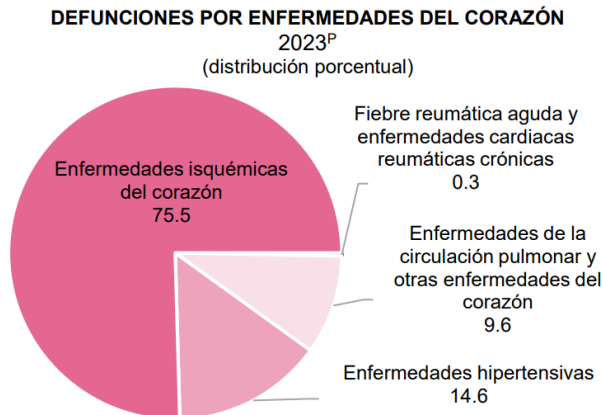


Figura 4. Defunciones por enfermedades cardiovasculares (INEGI, 2023).

2.4 Hipertensión

2.4.1 Descripción

La presión o tensión arterial (TA) es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de las arterias como resultado del bombeo del corazón (OMS, 2023); está determinada por dos factores: el débito cardíaco y la resistencia periférica total. El débito cardíaco depende de la contractibilidad miocárdica y del volumen circulante y la resistencia periférica depende del tono del árbol arterial y de las características estructurales de la pared arterial. La Figura 5 muestra la compleja red de factores involucrados en el equilibrio de la TA (Tagle, 2018).

En el adulto, la tensión arterial normal es cuando la tensión sistólica (contracción del corazón) es de 120 mm de Hg y la tensión diastólica (relajación del corazón) es de 80 mm de Hg (OMS, 2023).

La hipertensión arterial (tensión arterial alta o elevada) (HTA) es una enfermedad que se caracteriza por la existencia de una alteración en la que los vasos sanguíneos tienen una tensión constantemente alta (OMS, 2023). Se diagnostica hipertensión, cuando un paciente presenta una tensión sistólica igual o mayor a 140 mm de Hg y/o tensión diastólica igual o mayor a 90 mm de Hg (Peraza-Zaldívar y col., 2019). En la Tabla 1, se muestran la definición y la clasificación de los valores de hipertensión arterial.

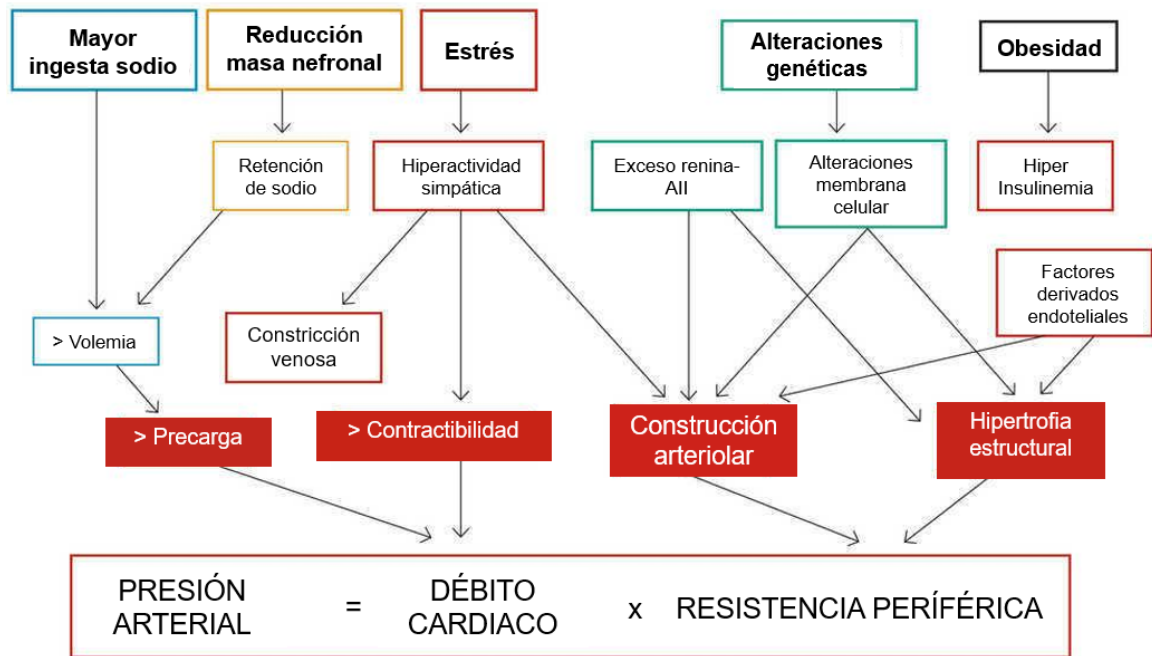


Figura 5. Regulación de la presión arterial (Tagle, 2018).

A la hipertensión, también se le conoce como asesino silencioso, ya que no produce síntomas alertadores de que algo anormal está pasando en el cuerpo. La HTA es un factor muy importante para el desarrollo de las demás ECV (Kjeldsen, 2018; Fuchs y Whelton, 2020). En México, la HTA constituye uno de los principales problemas de salud pública, con un tercio de los adultos la padece. Lo cual, representa una prevalencia del 31.5% en la población. Cabe destacar que esta incidencia ha permanecido estable en el último año reportado. Cabe resaltar, el 43 % de los hipertensos desconocen que padecen esta enfermedad (Peraza-Zaldívar y col., 2019; ENSANUT, 2024).

Tabla 1. Clasificación de los valores de presión arterial (Peraza-Zaldívar y col., 2019).

GRUPO	Presión arterial sistólica (mm Hg)	Presión arterial diastólica (mm Hg)
Óptima	<120	<80
Normal	120 – 129	80 – 84
Normal-alta	130 – 139	85 – 89
HTA grado 1	140 – 159	90 – 99
HTA grado 2	160 – 179	100 – 109
HTA grado 3	> 180	>110
HTA sistólica aislada	> 140	<90

2.4.2 Tratamiento de la hipertensión

Los estudios previos han demostrado que el tratamiento farmacológico de la hipertensión disminuye la morbilidad y la mortalidad cardiovascular. La OMS y la sociedad internacional de hipertensión clasifican a los fármacos antihipertensivos en seis grupos, de acuerdo con su mecanismo de acción (Bragulat y Antonio, 2001).

2.4.2.1 Alfabloqueantes

Los alfabloqueantes, también conocidos como antagonistas α -adrenérgicos, son fármacos utilizados para el tratamiento de la hipertensión (Laurent, 2017). Se clasifican en bloqueantes no selectivos $\alpha_1 + \alpha_2$ y bloqueantes selectivos α_1 . Los bloqueadores α_1 disminuyen la presión arterial por bloqueo postsináptico, anulando el efecto vasoconstrictor de la noradrenalina y provocando dilatación arterial y venosa (Civantos-Calzada y Aleixandre De Artinano, 2001). Los siguientes fármacos son ejemplos de alfabloqueantes: fentolamina, fenoxibenzamina, prazosina, terazosina, doxazosina, alfuzosina y tamsulosina (Flórez, 2014).

2.4.2.2 Betabloqueantes

Los fármacos β -bloqueantes, también llamados antagonistas β -adrenérgicos, son utilizados para tratar diversas enfermedades cardiovasculares. Estos se clasifican en no selectivos, que producen un bloqueo competitivo en los receptores β_1 y β_2 y los selectivos, que presentan mayor afinidad por el receptor β_1 (Lang y col., 2015). Los receptores β -adrenérgicos son receptores acoplados a proteínas Gs, cuya estimulación activa a la enzima adenilato ciclasa (AC), la cual produce un aumento del 3',5'-adenosina monofosfato cíclico (AMPc) en el espacio intracelular. Este aumento de la concentración de AMPc activa la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), la cual fosforila múltiples proteínas como las contráctiles, los canales de calcio, el fosfolamban y múltiples factores de transcripción nuclear que ejercen diversas actividades fisiológicas en el corazón. En el corazón, la PKA fosforila y activa los canales de Ca^{2+} tipo L y los canales RyR2 (receptor de Rianodina 2) del retículo sarcoplasmático. El resultado es un aumento de las concentraciones de calcio, lo que a su vez ocasiona un aumento en la contractilidad (efecto inotrópico positivo) y un aumento en la frecuencia cardíaca. Cuando la PKA fosforila al fosfolamban disminuye su actividad inhibitoria sobre la SERCA2a (ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico), facilitando la reincorporación del Ca^{2+} intracelular en el retículo sarcoplasmático. PKA fosforila también a la troponina I, lo que favorece la disociación del complejo TnC- Ca^{2+} . Estos dos últimos efectos incrementan el tiempo de relajación cardíaca (efecto lusitrópico positivo). Los β -bloqueantes se unen selectivamente a los receptores β -adrenérgicos, produciendo un antagonismo competitivo y reversible de los efectos de las catecolaminas sobre estos receptores localizados en el corazón. Este antagonismo produce una disminución en la frecuencia cardíaca, en la contractilidad cardíaca y una disminución en la presión arterial. Algunos ejemplos de este grupo de fármacos son: propranolol, nadolol, metoprolol, nebibolol (López-Sendó y col., 2004; Flórez, 2014).

2.4.2.3 Antagonistas de los canales de Ca^{2+}

El calcio regula varios procesos, entre ellos la contracción de los músculos estriado, liso y cardíaco, mediante un incremento de la concentración intracelular de este ion. En el músculo liso, el calcio citosólico se une a la proteína calmodulina, formando un complejo calcio-calmodulina, que activa a la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK). Esta a su vez fosforila a la cadena ligera de miosina que facilita la interacción de la actina con el calcio. La relajación muscular se produce mediante el antagonismo de los canales de calcio tipo L, lo cual genera una disminución de los niveles de calcio intracelular que reduce la actividad de la MLCK y, por consecuencia, predomina la cadena ligera de miosina defosforilada CLMP (inactiva). En el músculo cardíaco, el proceso se inicia con la llegada de un impulso nervioso que conduce a la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs). El flujo de iones hacia el citoplasma incrementa la concentración de calcio. Al antagonizar estos canales, disminuye la presión arterial, debido a la relajación en el músculo liso arteriolar y a la resistencia vascular periférica. Estos antagonistas también bloquean este tipo de canales en corazón, reduciendo su contracción y su frecuencia cardíaca. Algunos fármacos antagonistas de canales de Ca^{2+} son: dihidropiridinas (nifedipino, amlodipino, felodipino, nocardipino, isradipino y nimodipino), bencilalquilaminas (verapamilo) y benzotiazepinas (diltiazem) (Flórez, 2014).

2.4.2.4 Diuréticos

Este grupo de fármacos actúa directamente en el riñón, produciendo una pérdida de Na^+ y agua del organismo (Flórez, 2014), dando como resultado una disminución de la presión arterial, mediante una reducción del volumen de líquido extracelular. Al disminuir el volumen plasmático que se produce en respuesta a un aumento de la excreción de Na^+ , reduce el retorno venoso y disminuye el gasto cardíaco. Los diuréticos se pueden dividir en: inhibidores de la anhidrasa carbónica (acetazolamida), diuréticos de asa (furosemida), tiazidas (hidroclorotiazida) y ahorradores de potasio (amilorida) (Saturno-Chiu, 2017; Laurent, 2017).

2.4.2.5 Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs)

Los IECAs son fármacos de primera elección para tratar la hipertensión (Kaur y col., 2015). La enzima convertidora de angiotensina (ECA) hidroliza un dipéptido carboxilo terminal de la angiotensina I para producir la angiotensina II, un octapéptido que incrementa la presión arterial. La inhibición de esta enzima evita la producción de angiotensina II (Saturno-Chiu, 2017), lo cual ayuda a reducir la presión sanguínea por medio de la reducción de la resistencia vascular periférica, sin incrementar el gasto cardíaco, la frecuencia cardíaca o la contractibilidad. Este grupo incluye los siguientes fármacos: captopril, enalapril, lisinopril, fosinopril, quinapril y ramipril (Kaur y col., 2015).

2.4.2.6 Antagonistas de los receptores de angiotensina II

Los antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA II) son recetados para tratar la hipertensión arterial, como monoterapia o en conjunto, cuando los IECAs no son tolerados (Garay y col., 2017).

El sistema renina-angiotensina es una compleja cascada enzimática, que da como resultado la formación de angiotensina II, que es un vasoconstrictor. Por su parte, la angiotensina II tiene dos tipos de receptores: los AT1 y los AT2. Los ARA II actúan bloqueando la unión de la angiotensina II con su receptor AT1 (presente en vasos sanguíneos y corteza adrenal). La unión es competitiva y la acción es irreversible. Esto evita la vasoconstricción y la producción de aldosterona, llevando así a una reducción de la resistencia periférica, así como la disminución de la volemia y dando como consecuencia una disminución de la presión arterial (Garay y col., 2017). Algunos ejemplos de fármacos ARA II son: losartán, candesartán, eprosartán, irbesartán, valsartán, telmisartán y olmesartán (Flórez, 2014).

Finalmente, cabe mencionar que la utilización terapéutica de los grupos de fármacos antihipertensivos se debe basar en varios parámetros, como la presencia de enfermedades asociadas, efectividad, tolerancia o impacto sobre la calidad de vida y efectos secundarios (Bragulat y Antonio, 2001). En la Tabla 2, se mencionan los

efectos secundarios de los fármacos antihipertensivos (Peraza-Zaldívar y col., 2019).

Tabla 2. Efectos secundarios de los grupos de fármacos antihipertensivos (Peraza-Zaldívar y col., 2019).

FÁRMACO	EFECTOS SECUNDARIOS
Diuréticos tiazídicos y de asa	Hipocalemia, aumento en los niveles de ácido úrico, hiperglucemia e hiperlipidemia.
Diuréticos ahorradores de K ⁺	Hipercalemia, ginecomastia y disfunción sexual en el varón (estas dos últimas producidas por la espironolactona).
Betabloqueantes	Broncoespasmo, depresión, insuficiencia vascular periférica, hipertrigliceridemia.
Alfabloqueantes	Hipotensión ortostática y taquicardia.
Antagonistas de canales de Ca ²⁺ tipo dihidropiridinas (nifedipina)	Taquicardia, cefalea, enrojecimiento facial, edemas pretibiales.
Antagonistas de canales de Ca ²⁺ tipo verapamilo o diltiazepam	Crono e inotropismos negativos y estreñimiento.
IECAs	Tos irritativa, erupciones y disgeusia.
Antagonistas de receptores de Angiotensina II	Mareo.

2.5 Plantas medicinales en el tratamiento de enfermedades

2.5.1 Importancia medicinal

Desde la antigüedad, las plantas se han utilizado con fines terapéuticos para tratar diversos padecimientos. Existen escritos antiguos que describen el uso de las plantas como remedios. Por ejemplo, el hombre primitivo, de quien datan las primeras evidencias arqueológicas de las preparaciones a base de hierbas, así como las civilizaciones del Antiguo Egipto y Mesopotamia, las cuales describieron las propiedades de las hierbas en cientos de manuscritos (Sucher y Carles, 2008; Sharma y Sarkar, 2013; Scossa y col., 2018).

En el año de 1534 a.C., la civilización egipcia redactó un documento médico llamado “Papiro de Ebers”, en donde se describen diversas preparaciones farmacéuticas y múltiples drogas, tanto de origen animal como de origen vegetal, entre ellas el ajo, la cebolla y el enebro. Mientras que en la cultura india, en el año 1500 a.C., en el poema épico de los “Vedas”, se menciona el uso de varias plantas medicinales y, en el año 700 a.C., el médico Chakara Samhita describió alrededor de 350 plantas de uso medicinal (Velasco-Lezama y col., 2004).

Otro referente importante es la obra *Perí Hýles Iatrikés* más conocida como “De Materia Médica”, que fue escrita por Dioscórides en el siglo I d.C. y que es considerada la precursora de las actuales farmacopeas. Este trabajo se compone de 5 libros en los que se discuten más de 600 plantas, 35 productos animales y 90 minerales con aplicaciones médicas e incluye el origen de la planta, su hábitat, sus características físicas, el método de preparación medicinal, una lista de los usos terapéuticos y hace referencia a algunos efectos secundarios nocivos para la salud (Tobyn y col., 2011).

En el caso de los países de América, existen registros sobre el uso medicinal ancestral precolombino de los recursos naturales, particularmente de vegetales, para paliar o curar enfermedades. Sin embargo, al igual que la obra De Materia Medica, el texto impreso más reconocido por su impacto como material de referencia para la práctica de lo que actualmente corresponde respectivamente, a la Medicina y a la Farmacia en Mesoamérica es el *Libellus de Medicinalibus Indorum*

Herbis, mejor conocido como Códice de la Cruz-Badiano, que data del año 1552 y se denominó así porque el material original con textos y dibujos fue escrito en Náhuatl por Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano (Turner, 2007). Es así que la Medicina Tradicional y Complementaria ha perdurado hasta la actualidad, con más del 88% de los países miembros de la OMS que reconocen su uso por su población (WHO, 2023) y, particularmente en los países en desarrollo, se estima que alrededor del 80% de la población recurre al uso de los remedios tradicionales, principalmente los elaborados a partir de plantas, para tratar sus necesidades de atención médica y cerca del 25.3% de los medicamentos actuales son de origen vegetal (Motalib y col., 2014). Además, 53.3% de los medicamentos actuales provienen directamente de organismos (plantas, bacteria, hongos, animales) o derivan de ellos, incluyendo los sintéticos (Newman y Cragg, 2020). En los últimos años, ha resurgido el interés por la investigación de los medicamentos derivados de plantas medicinales. Gracias al conocimiento de los sistemas de salud antiguos, los productos naturales son la fuente principal del descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (Motalib y col., 2014; Salehi y col., 2019).

2.5.2 Género *Crataegus*

2.5.2.1 Taxonomía del género *Crataegus*

El género *Crataegus* pertenece a la familia Rosaceae de la subfamilia *Maloideae*, supertribu *Pyroidae*, subtribu *Pyreae* (Zuiter y col., 2012). Se ha reportado que existen aproximadamente 1000 especies de este género, las cuales están distribuidas en Europa, Asia Central y Oriental, Mediterráneo, África del Norte y América del Norte (Alirezalu y col., 2020). La taxonomía del género *Crataegus* es una de las más complejas entre las plantas superiores a nivel mundial (Núñez-Colín y Hernández-Martínez, 2011).

En México, a las especies del género *Crataegus* se les conoce comúnmente como “tejocotes”, término que proviene del Náhuatl “te-xocotl” que significa fruta dura y agria (Núñez-Colín y Hernández-Martínez, 2011). Los prehispánicos cultivaban estas especies para consumo personal y posteriormente las cultivaban para fines

comerciales. Por otra parte, en México se utilizan los frutos de tejocote en las celebraciones de todos los santos y en la elaboración del ponche de fruta. Por esta razón, las especies de *Crataegus* son de gran importancia en la cultura tradicional mexicana (Núñez-Colín y col., 2008; López-Fitz 2023; Cui y col., 2024).

En 1997, Phipps reportó 13 especies del género, las cuales están distribuidas en el norte y centro de México y 2 especies en el sur; de estas, 9 o 10 son endémicas. Las 15 especies se dividen en seis series taxonómicas, las cuales se describen a continuación (Núñez-Colín y col., 2008).

Serie 1. *Parvifoliae* (Loudon) Rehder: *Crataegus uniflora* distribuida en Tamaulipas.

Serie 2. *Mexicanae* (Loudon) Rehder: *Crataegus mexicana* distribuida en el estado de México, Hidalgo, Puebla, Michoacán, Jalisco, Guanajuato y Veracruz; *C. stipulosa* distribuida en Chiapas, Guerrero, Oaxaca y Veracruz; *C. nelsoni* Eggleston localizada en Chiapas.

Serie 3. *Crus-galli* (Loudon) Rehder: *C. gracilior* distribuido en Hidalgo, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas, Michoacán, Estado de México, Oaxaca y Veracruz; *C. rosei* Eggleston, dividida en 2 subespecies: *C. rosei* subesp. *parryana* distribuida en Tamaulipas, San Luis Potosí, Nuevo León e Hidalgo. *C. rosei* subesp. *rosei*, presenta tres variedades botánicas: *rosei* subesp. *rosei* var. *rosei* distribuida en Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Nayarit, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa y Tamaulipas; *C. rosei* subesp. *rosei* var. *Mahindae* distribuida en San Luis Potosí, Nuevo León y Tamaulipas; *C. rosei* subesp. *rosei* var. *amoena* localizada en Coahuila y Nuevo León (Figura 6).

Serie 4. *Madrenses* J. B. Phipps: *C. tracyi*, presenta tres variedades botánicas: *C. tracyi* var. *tracyi* localizada en Texas, *C. tracyi* var. *coahuilensis* localizada en Coahuila, *C. tracyi* var. *Madrensis* distribuida en Coahuila y Nuevo León, *C. aurescens* J. B. Phipps encontrada en Coahuila y Nuevo León.

Serie 5. *Greggianae* J. B. Phipps: *C. greggiana* Eggleston, presenta dos variedades: *C. greggiana* var. *greggiana* dispersas en Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Texas; *C. greggiana* var. *pepo* en Coahuila y Nuevo León; *C. serratissima* J. B. Phipps en Hidalgo y probablemente Querétaro, San Luis Potosí y Nuevo León; *C.*

sulfurea J. B. Phipps dispersa en Coahuila y Nuevo León; *C. grandifolia* J. B. Phipps, presenta dos variedades botánicas: *C. grandifolia* var. *grandifolia* localizada en Coahuila y *C. grandifolia* var. *potosina* localizada en Nuevo León.

Serie 6. *Baroussanae* J. B. Phipps: *C. baroussana* Eggleston, dividida en dos variedades botánicas: *C. baroussana* var. *baroussana* distribuida en Coahuila y Nuevo León, *C. baroussana* var. *jamensis* localizada en Coahuila; *C. cuprina* J. B. Phipps encontrada en Nuevo León; *C. johnstonii* J. B. Phipps localizada en Coahuila (Núñez-Colín y Hernández-Martínez, 2011).

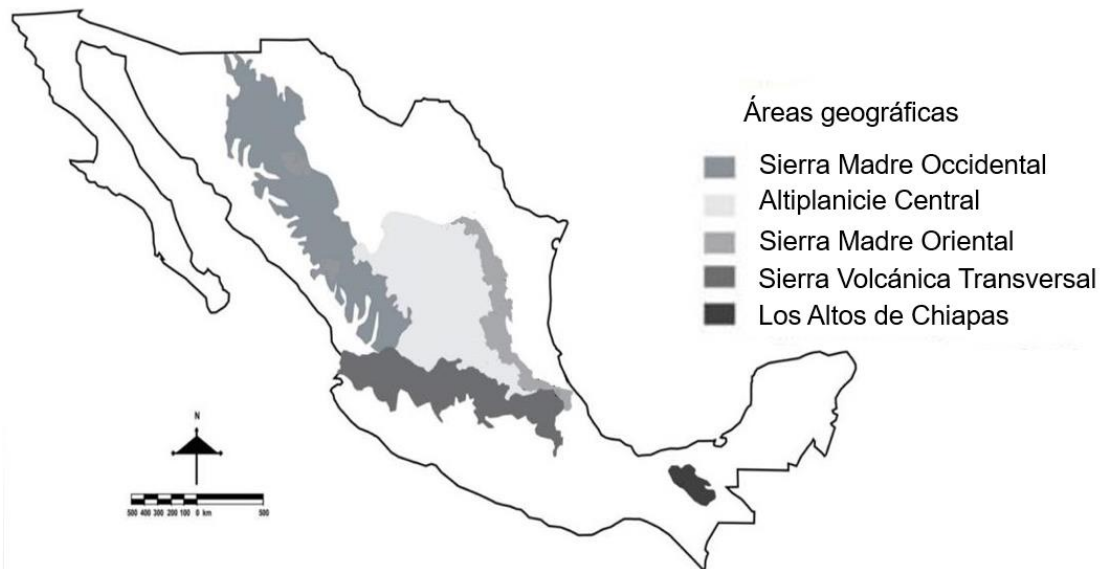


Figura 6. Distribución geográfica de la especie *Crataegus rosei* en México (Modificada de Piedra y col., 2016).

2.5.2.2 Uso tradicional del Género *Crataegus*

Las especies del género *Crataegus* han sido cultivadas también por el consumo de su fruta en algunos países de Asia, de Europa y del Continente Americano (Zarrei y col., 2015). Estas especies se han usado en la medicina tradicional para tratar diferentes problemas de salud, principalmente enfermedades cardiovasculares (Kallassy y col., 2017). Sin embargo, también se emplean para el tratamiento de

disnea, asma, hiperlipidemia, problemas digestivos (diarrea), enfermedad de la vesícula biliar, el insomnio y como agente antiespasmódico (Wang y col., 2013).

Los remedios elaborados a partir de hojas y flores del género *Crataegus* fueron mencionados por primera vez por Dioscórides en su libro titulado “De Materia Medica”, en el siglo I d.C, principalmente para tratar enfermedades cardíacas y fortalecer el corazón “envejecido” (Nabavi y col., 2015). A finales del siglo XIX, se retoma nuevamente en la medicina tradicional el uso de *Crataegus* (Du y col., 2019); en el año de 1941, se incluyeron en la farmacopea alemana los extractos del género *Crataegus* y en el 2016 la Agencia Europea del Medicamento (EMA), a través del Comité de Medicamentos a Base de Hierbas (HMPC), reconoció el uso tradicional de *Crataegus* para tratar algunos síntomas cardíacos (Holubarsch y col., 2018; Cloud y col., 2020).

En la actualidad, se utilizan preparaciones del género *Crataegus* para tratar enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, las enfermedades coronarias, la insuficiencia cardíaca y las arritmias cardíacas. Asimismo, posee efecto ionotrópico positivo, efecto protector del endotelio y a la lesión por isquemia/reperfusión (Alp y col., 2016).

Se ha reportado que el efecto farmacológico de las especies del género *Crataegus* se debe principalmente a los polifenoles, bioflavonoides, glucósidos de flavonoides, triterpenoides, taninos (procianidinas oligoméricas), antioxidantes, vitaminas, ácidos orgánicos y algunos ácidos fenólicos (Alirezalu y col., 2020; Du y col., 2019).

2.5.2.3 Compuestos químicos predominantes en el género *Crataegus*

El género *Crataegus* posee grandes cantidades de carbohidratos, vitaminas, minerales (Zhang y col., 2020) y diferentes metabolitos secundarios, entre ellos flavonoides, ácidos fenólicos, procianidinas, antocianinas, ácidos triterpénicos y lignanos (Yang y Liu, 2012). Los compuestos y el contenido de cada uno de ellos varían de acuerdo con la parte de la planta. Dentro de los compuestos encontrados en *Crataegus*, los polifenoles se encuentran entre los principales metabolitos secundarios bioactivos (Zhang y col., 2020). Por ejemplo, las procianidinas

oligoméricas y sus glucósidos son abundantes en las frutas y, en las hojas, se encuentran presentes los flavonoles, los glucósidos de flavonol y las C-glucosil flavonas (Yang y Liu, 2012).

2.5.2.3.1 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de origen natural que se encuentran en frutas, verduras y plantas naturales; se dividen en antocianinas, flavan-3-oles, flavanonas, flavonas, flavonoles e isoflavonas (Kent y col., 2018). Se ha demostrado que estos compuestos poseen un alto valor terapéutico, ya que ayudan a tratar algunas enfermedades crónicas como algunos tipos de cánceres, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y enfermedades neurodegenerativas (Shi y col., 2019).

De las hojas, flores, bayas y frutas del género *Crataegus* se han aislado diferentes flavonoides (Shi y col., 2019). Por ejemplo, en las flores y hojas, se han aislado flavonoides de tipo flavonol y flavanona (Soares y col., 2019), principalmente en forma de glucósidos (Abuashwashi y col., 2016), mientras que en las bayas se han aislado flavonoides de tipo antocianinas (Soares y col., 2019). Gracias a estos compuestos, el género presenta actividad terapéutica (Lund y col., 2020).

Los principales flavonoides identificados en las especies del género *Crataegus* son vitexina, isovitexina, hiperósido, rutina, quercetina, (+)-catequina, (-)-epicatequina (Abuashwashi y col., 2016).

En las especies asiáticas del género, también se han identificado (-)-epicatequina, vitexina, 2''-O-ramnosilvitexina, hiperósido, isoquercitrina (Wen y col., 2017), rutina, 4''-O-glucósilvitexina, 2''-O-rhamnosilvitexina, shanyenósido A, quercetina (Zhu y col., 2015), isoorientina, orientina, 3-O-glucósil-8-metoxi-kaempferol, bioquercetina, pinnatifidina, leucocianidina, luteolina, herbacetina, santina (Wu y col., 2014) y en las especies europeas se identificaron tres glucósidos de apigenina, cratenacina (2''-O-ramnosil-4''-acetilvitexina) (Edwards y col., 2012), naringenina, hiperósido, rutina, isovitexina, vitexina y 2''-O-ramnosilvitexina (Figura 7) (Lund y col., 2020).

En las especies mexicanas, se han aislado e identificado rutina, quercetina, kaempferol, (+)-catequina (Hernández-Pérez y col., 2014), 3-O-glucósilquercetina, 3-O-ramnosilquercetina, quercetina 3-O-ramnosil-(1→6)-glucósido y 3-O-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-glucósilquercetina (García-Mateos y col., 2013), epicatequina y 6-hidroxicumarina-(4"→8)-(-)-epicatequina (Rico-Chávez, 2016). En las hojas de *C. rosei* se identificaron la vitexina, epicatequina y rutina (Rodríguez-Martínez, 2021.)

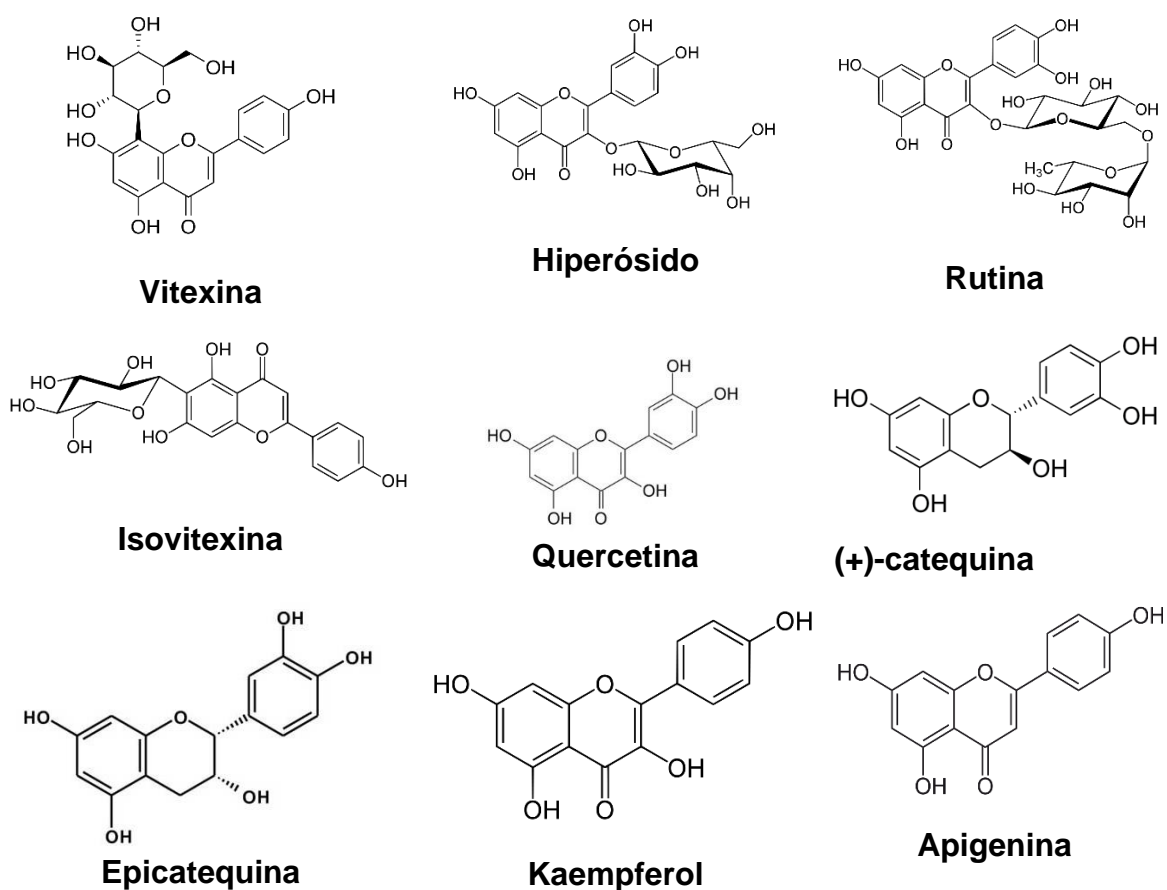


Figura 7. Estructuras de los flavonoides identificados en el género *Crataegus*.

2.5.2.3.2 Proantocianidinas (taninos condensados)

La palabra tanino fue utilizada para identificar a algunos compuestos orgánicos que sirven para curtir pieles de animales, actividad que en inglés se conoce como

tanning (del verbo tan: curtir). En la actualidad, este término es utilizado para nombrar a un grupo de metabolitos secundarios heterogéneos de masa molecular alta y complejidad elevada (Olivas-Aguirre y col., 2015).

Los taninos se clasifican normalmente en dos grupos: A) los taninos hidrolizables, los cuales se hidrolizan por la acción de los ácidos, bases o enzimas, en un azúcar, un polialcohol y un ácido fenolcarboxílico. Dentro de esta categoría, existe la subclasificación siguiente: los galotaninos (con ácido gálico) y elagitaninos (con ácido elágico), B) el segundo grupo está integrado por los taninos condensados [también llamados taninos no hidrolizables o proantocianidinas (PA)], con núcleo de flavonoide, los cuales constituyen una clase de polifenoles oligoméricos y poliméricos con flavan-3-oles [(+)-catequina y (-)-epicatequina] como bloques monoméricos de construcción, unidos mediante enlaces C–C. Éstos se pueden clasificar en tipo A y tipo B, dependiendo de la unión de las unidades de flavan-3-ol (Hellenbrand y col., 2015).

En las proantocianidinas de tipo A, los flavan-3-oles se unen en $2\beta \rightarrow O \rightarrow 7$ o $2\beta \rightarrow O \rightarrow 5$ (a través de enlaces interflavanos) y las proantocianidinas de tipo B están unidas entre el C-4 y el C-6 o C-8 del anillo A flavánico (Hellenbrand y col., 2015).

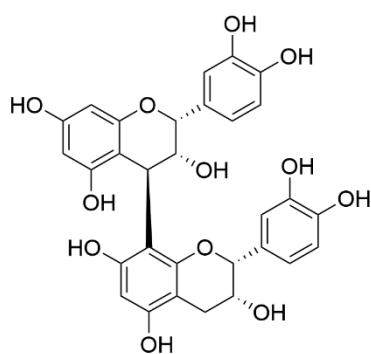
Por otra parte, se ha reportado que uno de los ingredientes activos de las especies del género *Crataegus* son las procianidinas (Sendker y col., 2013). En hojas y flores de *Crataegus laevigata* y *Crataegus monogyna*, se han aislado los dímeros B-2, B-4 y B-5, trímeros C-1 y tetrámero D-1 (Svedstrom y col., 2002; Nabavi y col., 2015); estas procianidinas pertenecen al grupo de proantocianidinas de tipo B; en *Crataegus laevigata* se identificó el pentámero E. En la Figura 8 se muestran las estructuras de algunas de las procianidinas ya identificadas en el género *Crataegus* (Yang y Liu, 2012).

2.5.2.3.3 Triterpenos

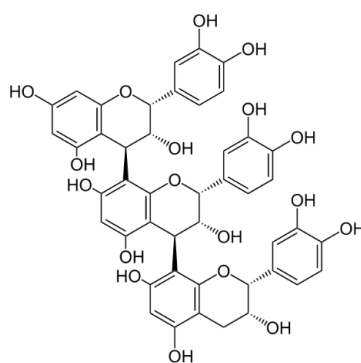
Los triterpenos son un grupo de metabolitos secundarios biológicamente activos, que se encuentran en los tejidos vegetales y pertenecen a uno de los grupos más

grandes de terpenos. Se estima que existen más de 4,000 triterpenos en la naturaleza (Bahadır-Acikara y col., 2018).

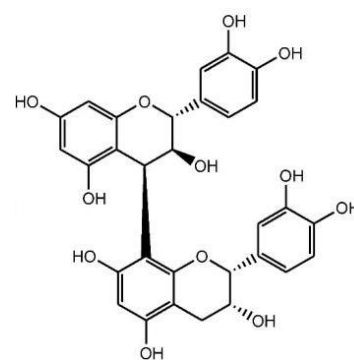
La estructura de los triterpenos, que por definición consta de 30 carbonos, está formada por el dimetilalildifosfato como unidad iniciadora y unidades de isopentenildifosfato como extendedoras, que se unen de cabeza a cola. Los triterpenos se dividen en lineales, tetracíclicos y pentacíclicos, e incluyen anillos más frecuentemente de cuatro y cinco miembros, pero también de dos y tres miembros (Chudzik y col., 2015).



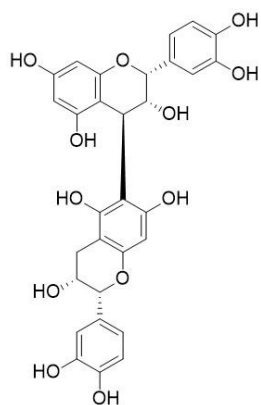
Procianidina B2



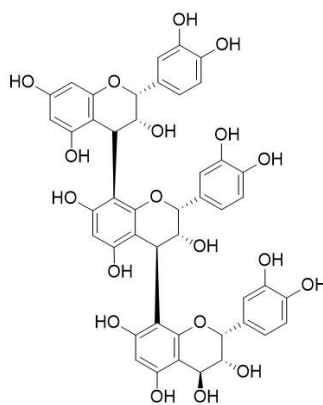
Procianidina C1



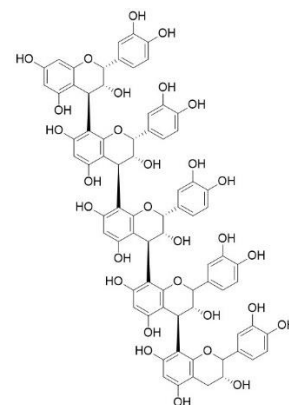
Procianidina B-4



Procianidina B-5



Procianidina D-1



Procianidina E

Figura 8. Estructuras de algunas procianidinas encontradas en las especies del género *Crataegus*.

En especies del género *Crataegus* pertenecientes a Europa y Asia, se han identificado triterpenos y sus derivados como ácido ursólico, ácido 2 α ,3 β ,19 α -trihidroxiursólico, ácido corosólico, cuneataol, cicloartenol, uvaol, ácido oleanólico, ácido crataególico, butirospermol, 24-metilen-24-dihidrolanosterol y betulina (Wu y col., 2014).

Los estudios químicos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación de la Facultad de Química de la UAQ sobre especies mexicanas de *Crataegus* han permitido aislar e identificar algunos triterpenos. En las hojas de *C. gracilior*, se aislaron los ácidos ursólico y corosólico (Hernández-Pérez y col., 2014) y en las flores de esta misma especie, los ácidos corosólico y euscáfico. Además, en las hojas de *C. rosei*, se aislaron e identificaron los ácidos ursólico, euscáfico, maslínico y corosólico (Figura 9) (López-Fitz, 2019).

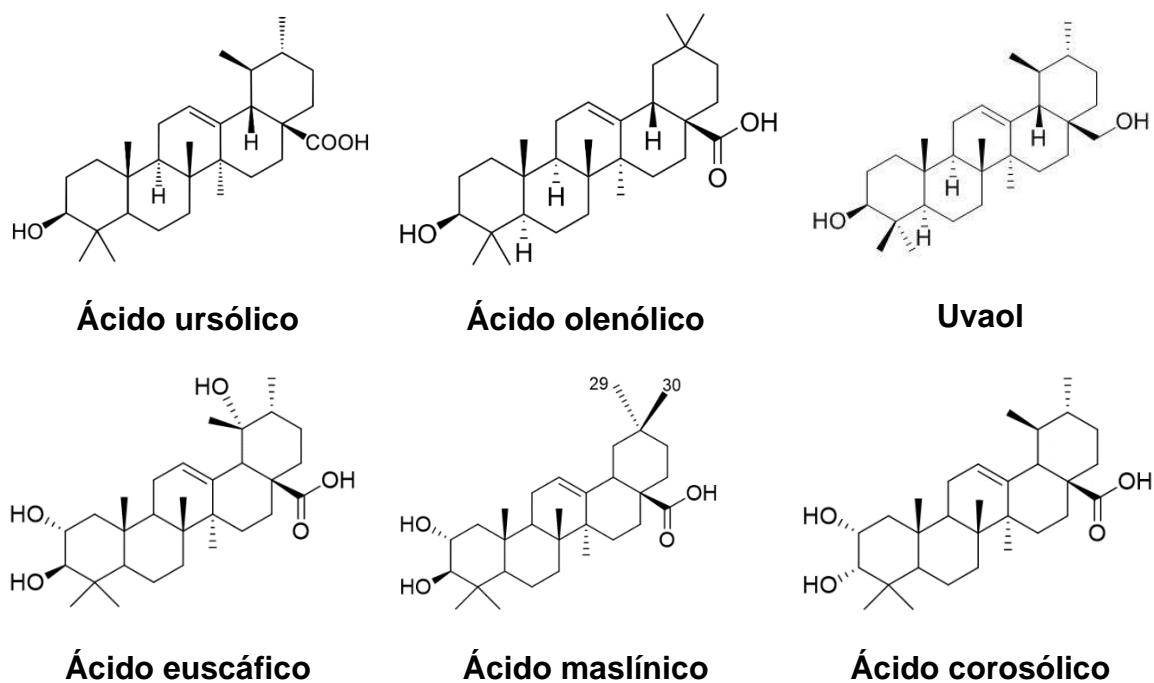


Figura 9. Estructuras de los triterpenos identificados en especies del género *Crataegus*.

2.5.2.4 Efectos farmacológicos de los metabolitos secundarios identificados en *C. rosei*

Se ha demostrado que el ácido ursólico posee varias actividades farmacológicas, entre las cuales destacan las actividades enfocadas en la prevención y el tratamiento del cáncer, la diabetes, las enfermedades hepáticas, las enfermedades cerebrales y cardiovasculares (Seo y col., 2018). Con respecto a las enfermedades cardiovasculares, se ha comprobado que el ácido ursólico posee actividad vasodilatadora en anillos aórticos de rata precontraídos con fenilefrina. Dicho efecto depende de las vías del NO/cGMP y del H₂S/K_{ATP}, mediante la activación directa de las enzimas óxido nítrico sintasa (eNOS) y la cistationina gamma-liasa (CSE) en el sitio de unión alostérico (Luna-Vázquez y col., 2013). Adicionalmente, existen investigaciones que demuestran que este triterpeno posee actividad antiaterogénica. Por otra parte, Li y col. (2018) evidenciaron en estudios *in vitro* e *in vivo* que el ácido ursólico atenúa la aterosclerosis mediante la inhibición del receptor 1 de la lipoproteína de baja densidad (LDL) oxidada (LOX-1) a través de la vía de señalización NF-κB. También, se ha comprobado en estudios *in vitro* e *in vivo* que la administración intragástrica de 40 mg/kg de este triterpeno disminuye la frecuencia cardíaca. Además, la administración intraperitoneal con 2 y 6 mg/kg durante 10 días inhibe la estenosis luminal, en un modelo de lesión vascular en ratas (Seo y col., 2018). Todos estos datos hacen del ácido ursólico una molécula que como metabolito vegetal cobra especial interés para su uso en enfermedades cardiovasculares.

Por su parte, el ácido maslínico presenta actividades antitrombótica y cardioprotectora. Dentro de esta última, destaca su actividad vasodilatadora en aorta aislada de rata (normotensas e hipertensas), mediante la participación de la vía del óxido nítrico (Rodríguez-Rodríguez y col., 2006; Claro-Cala y col., 2020).

En cuanto al ácido euscáfico, este presenta actividad antiaterosclerótica (Zhang y col., 2006) y vasodilatadora. Su mecanismo de acción es mediado a través de la activación de la vía de las prostaciclina (PGI₂), del óxido nítrico y, además, tiene la

capacidad de bloquear los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L (Al-Habib y col., 2015).

En un estudio se demostró que la administración dietética de la (-)-epicatequina en ratas espontáneamente hipertensas disminuyó significativamente su presión arterial y mejoró su función endotelial a través de un aumento en la producción del NO (Galleano y col., 2013). Asimismo, se evidenció que este flavonoide aumenta la producción del NO, mediante la activación de la eNOS a través de mecanismos dependientes e independientes de Ca^{2+} (Ramírez-Sánchez y col., 2018). La vía dependiente de Ca^{2+} involucra la participación de la vía fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) y la independiente mediante el complejo entre eNOS, AKT y HSP90 (proteína de shock térmico de 90 kDa) (Ramírez-Sánchez y col., 2012).

Se ha reportado que la vitexina tiene múltiples efectos farmacológicos que incluyen la actividad antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana, anticonceptiva, anticancerígena, antinociceptiva, antidiabética y, además, cuenta con propiedades cardioprotectoras con alta eficacia. El efecto hipotensor se debe a diversos mecanismos que inducen la activación de las vías del NO, la síntesis de PGI_2 y el bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo L (Ameen y Al-Habib, 2021).

Adicionalmente, se ha demostrado que la rutina también posee efecto vasodilatador. Dicho efecto está mediado por la vía del óxido nítrico, de las prostaglandinas y la activación de los canales de K_{ATP} (Xia y col., 2005).

2.6 Medicamentos a base de plantas

Los medicamentos a base de plantas o fitomedicamentos están regulados en México por la Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) bajo la denominación de *medicamentos herbolarios* [FHEUM, 3.0, Ley General de Salud (LGS), 2013, NOM-SSA1-072]. Su definición se encuentra en el artículo 244 de la Ley General de Salud y en la Guía de Evaluación de Insumos para la Salud del Compendio Nacional de Insumos para la Salud (CSG, 2023), que a la letra los señalan como: “Los productos elaborados con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de una

planta o extractos y tinturas, así como jugos, resinas, aceites grasos y esenciales, presentados en forma farmacéutica, cuya eficacia terapéutica y seguridad ha sido confirmada científicamente en la literatura nacional o internacional”.

2.7 Control de calidad de los fitomedicamentos

El control de calidad de las moléculas activas de origen vegetal es complicado de llevar a cabo en los fitomedicamentos, ya que, en la mayoría de los casos, se desconoce gran parte de los componentes bioactivos. Es por ello que, para asegurar la identidad y la pureza, y garantizar la seguridad y eficacia de cualquier producto a base de plantas, es necesario determinar y establecer marcadores químicos.

Un marcador químico es un constituyente o un grupo de sustancias químicas presentes en un material vegetal, donde este puede ser por ejemplo hojas, flores, tallos, frutos, raíces, o preparados obtenidos de estos últimos, como extractos y tinturas, así como jugos, resinas, aceites esenciales y grasas. Por lo tanto, el propósito primordial de aquel es servir de mecanismo de control del material vegetal, con independencia de que tenga o no actividad farmacológica o terapéutica. Se utilizan estos marcadores para calcular la cantidad de material vegetal o de un preparado vegetal que existe en un producto herbolario medicinal (remedio, suplemento o medicamento). Sin embargo, se puede distinguir dos clases de marcadores: el “activo” y el “analítico”. El primero se refiere a la sustancia o grupo de sustancias que tienen la actividad farmacológica generalmente aceptada como responsable de la acción terapéutica. El segundo es el constituyente o grupo de constituyentes del material vegetal que sirven para propósitos analíticos de control (EMA, 2010).

La diferencia entre marcadores químicos, de acuerdo con las definiciones de la EMA (2010), permite ayuda a su vez, a diferenciar un extracto cuantificado de uno estandarizado. Con el primero, se ajusta el material vegetal o la preparación herbal a un intervalo definido de constituyentes (uno o más marcadores activos o analíticos), utilizando exclusivamente la mezcla de diferentes lotes de sustancias herbales y/o de preparaciones herbales, definiéndose este material vegetal como

extracto cuantificado. En el segundo caso, se adecúa la sustancia o la preparación herbal a un contenido definido de un constituyente o un grupo de constituyentes con actividad terapéutica conocida, generalmente, añadiendo excipientes o mezclando lotes de preparados herbales.

Por otra parte, dichos estándares o marcadores químicos son utilizados para calibrar y validar los métodos de prueba para el control de calidad de los materiales o de los extractos vegetales. La presencia de estos estándares es de vital importancia para establecer no sólo la calidad, sino también la seguridad y la eficacia asociadas con estos productos farmacéuticos comerciales (Schwarz y col., 2009).

Una vez establecidos los marcadores químicos, se debe de comprobar por medio de estudios de laboratorio que dicho método analítico satisface los requisitos establecidos por organizaciones internacionales para la aplicación analítica deseada. Este proceso se realiza considerando diversos aspectos como la moral, la ética, el aseguramiento de la calidad, los aspectos económicos y regulatorios (CNQFB, 2002).

Diversas organizaciones internacionales, como la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH por sus siglas en inglés: **I**nternational **C**onference on **H**armonization), la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA: **F**ood and **D**rug **A**dministration), la Agencia Europea de Medicamentos (EMA: **E**uropean **M**edicines **A**gency) y las normativas establecidas por las farmacopeas internacionales destacan la importancia de la validación de métodos analíticos y detallan los requerimientos necesarios para realizarla. La validación debe de incluir varios estudios, entre ellos, de especificidad, linealidad, exactitud, precisión y límite de detección y establecer los límites cuantitativos en caso de ser un método cuantitativo (Nafiu y col., 2017). Los parámetros establecidos por las organizaciones internacionales necesarios para la validación se describen a continuación.

1. Linealidad. La linealidad de un método se define como su capacidad para asegurar que los datos obtenidos directamente o por una transformación matemática son proporcionales a la concentración del analito (CNQFB, 2002).

2. Robustez. Es la medida de la capacidad del método analítico para permanecer estable con pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método, es decir, la robustez indica la fiabilidad del método durante su uso continuo (EMA, 2006).
3. Precisión (veracidad). La precisión se define como la veracidad del método analítico. Este parámetro manifiesta la proximidad de la concordancia o grado de dispersión entre un grupo de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de la misma muestra homogénea en las condiciones ya establecidas. La precisión se expresa como la varianza, la desviación estándar o el coeficiente de variación de un conjunto de medidas (EMA, 2006).
4. Repetibilidad. La repetibilidad se expresa como la concordancia entre los resultados obtenidos de diversas mediciones continuas del mismo mensurado bajo las mismas condiciones de medición, realizada por el mismo analista, utilizando los mismos instrumentos, métodos, condiciones y repeticiones en un periodo corto de tiempo (OIN, IEC 17025:2017).
5. Reproducibilidad. La reproducibilidad se expresa como la concordancia entre los resultados obtenidos de mediciones de la misma muestra, cambiando condiciones como el método de medición, analista, instrumento de medición, patrón de referencia, lugar, condiciones de uso y tiempo. La guía de validación de métodos analíticos menciona que los análisis se realicen por diferentes analistas, en distintos días u horas y por distintos laboratorios (CNQFB, 2002).
6. Límite inferior de cuantificación. Este límite se define como la concentración más baja del analítico en una muestra que es posible cuantificar de manera confiable con exactitud y precisión aceptable o el estándar de calibración más bajo. Cabe destacar que la señal del analito en esa concentración debe ser al menos 5 veces la señal de una muestra en blanco (EMA, 2006).
7. Límite de detección. La Organización Internacional de Normalización (OIN) lo define como la cantidad mínima de analito en una muestra que sea detectable, pero no forzosamente cuantificable como un valor exacto (OIN, IEC 17025:2017).

Todos los medicamentos que contengan derivados de productos sintéticos biotecnológicos o fitofármacos, para ser seguros y eficaces, deben cumplir los requisitos básicos establecidos en las Farmacopeas (Nafiu y col., 2017; LGS; 2013; FHEUM 3.0, 2021). Con respecto a los fitomedicamentos, éstos deben obedecer requisitos legales asociados con su fabricación, constitución, pruebas de seguridad, eficacia, estabilidad, almacenamiento y distribución.

Para fabricar toda clase de medicamentos, se siguen normas elaboradas por la OMS (Organización Mundial de la Salud), ISO (Organización Internacional de Estandarización) y NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de Estados Unidos). Estas organizaciones son las principales rectoras, junto con las farmacopeas de reconocimiento internacional como la Farmacopea Europea (PE) y la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) (Schwarz y col., 2009). En México, el organismo regulador es la COFEPRIS (**CO**misión **FE**deral para la **P**rotección contra **R**iesgos **S**anitarios) y los medicamentos herbolarios deben seguir las especificaciones de calidad establecidas en las monografías de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM 3.0, 2021).

2.8. Extractos cuantificados y estandarizados

Los extractos cuantificados se ajustan a una gama definida de constituyentes que son los marcadores activos. Los ajustes se realizan, como ya se mencionó, mezclando lotes de sustancias vegetales, utilizadas en el proceso de fabricación. Para estos extractos, el nombre y el contenido de los marcadores activos deben indicarse en un intervalo (EMA, 2010).

Los extractos estandarizados se ajustan dentro de una tolerancia aceptable a un contenido determinado de constituyentes con actividad terapéutica conocida. Como se puede leer en los ejemplos proporcionados por la Guía para la declaración de sustancias o materiales vegetales y preparaciones herbales en productos medicinales herbolarios y productos tradicionales medicinales herbolarios de la EMA (2010), la estandarización se consigue agregando excipientes para el ajuste a una determinada dosis del marcador químico en una mezcla o matriz de excipientes.

Esto debe también realizarse siguiendo un proceso de fabricación, de acuerdo con la edad y condición física del paciente. Estos extractos deben incluir en su etiqueta el nombre y el contenido del compuesto o compuestos con actividad terapéutica conocida (EMA, 2010, NOM-072-SSA-1-2012).

Los procesos generalmente implicados en la estandarización de los preparados de plantas medicinales se resumen en la Figura 10 (Nafiu y col., 2017).



Figura 10. Parámetro de estandarización para medicamentos herbolarios (Nafiu y col., 2017).

Hoy en día, se comercializan extractos estandarizados, utilizados para tratar diferentes patologías, entre los que se encuentran el “Optimized-SopungSunkiwon”, empleado para mejorar los trastornos neurodegenerativos en ancianos, el extracto “EGHB010” (un extracto estandarizado de *Paeoniae Radix* y *Glycyrrhizae Radix*), el cual es usado como analgésico, antiespasmódico y, en estudios recientes, se ha demostrado que tiene un efecto beneficioso en el tratamiento de la fuga vascular y

en el área de neovascularización coroidea (NVC) (Carvalho y col., 2018) y los extractos WS[®] 1442 y Li[®] 132, ambos obtenidos de especies de *Crataegus*, que son utilizados principalmente en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (Koch y Malek, 2011), entre otros.

2.8.1 Remedios herbolarios de *Crataegus* y fitomedicamentos

Los remedios herbolarios de hojas y flores de *Crataegus* se han descrito en la literatura médica desde el siglo I d.C. (Holubarsch y col., 2018) para el tratamiento de diversas enfermedades del ser humano (Nabavi y col., 2015), pero principalmente como tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Peters y col., 2012). Estos remedios están disponibles en varias presentaciones, incluyendo infusiones, tinturas, suplementos dietéticos, remedios a base de hierbas no regulados y extractos estandarizados (Koch y Malek, 2011).

En la actualidad, los extractos estandarizados de *Crataegus*, el Li[®] 132 y el WS[®] 1442, son los más estudiados y populares y se comercializan principalmente en Europa como medicamentos herbolarios tradicionales (Zorniak y col., 2017); estos dos extractos son preparados hidroalcohólicos, el primero con metanol y el segundo con etanol (Koch y Malek, 2011).

El WS[®] 1442 se comercializa en Europa para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, estadio II (clasificación de la New York Heart Association) y es recetado con una dosis diaria de hasta 900 mg (Niederseer y col., 2019). La información más específica del producto refiere ser es un extracto seco (de hojas y flores de *Crataegus monogyna* Jacq. y *Crataegus laevigata*), preparado con 45% de etanol y 55% de agua. Este extracto se ajusta en el intervalo de 17.3 a 20.1% de procianidinas oligoméricas; también incluye varios flavonoides como hiperósido, ramnosil vitexina, rutina y vitexina, así como triterpenoides y ácidos carboxílicos fenólicos (Holubarsch y col., 2018).

El Li[®] 132 es un extracto hidroalcohólico preparado con 70% de metanol y 30% de agua; se ajusta a 2.2% de flavonoides (Daniele y col., 2006; Wang y col., 2013) y es elaborado a partir de hojas y flores de *Crataegus oxyacantha* (Makdessi y col.,

1999). El Li[®] 132, al igual que el WS[®] 1442, es utilizado para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca moderada, estadio II (clasificación de la New York Heart Association) (Müller y col., 1996).

2.8.1.1 Propiedades farmacológicas y mecanismo de acción del extracto WS[®] 1442

El extracto estandarizado WS[®] 1442 posee efectos antiarrítmicos y cardioprotectores. Estos efectos se deben a la inhibición de la oxidación de lípidos, al aumento del flujo sanguíneo coronario y a sus propiedades antiinflamatorias (Niederseer y col., 2019; Holubarsch y col., 2018). Además, tiene la propiedad de proteger a los vasos sanguíneos gracias a la acción directa sobre el endotelio, lo que resulta del aumento de la producción de óxido nítrico (NO) y del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF). Estos dos factores controlan la homeostasis vascular (Anselm y col., 2009) y ayudan a proteger al endotelio de la hiperpermeabilidad endotelial, ayudando a prevenir la formación de edemas y procesos inflamatorios en la insuficiencia cardíaca (Holubarsch y col., 2018; Zorniak y col., 2017).

Otra propiedad muy importante es el efecto vasorrelajante, producido por un mecanismo dependiente del endotelio y mediado por una mayor liberación de NO del endotelio vascular (Zorniak y col., 2017). El incremento en los niveles de NO es debido, en parte, a las propiedades antioxidantes del extracto, el cual disminuye su degradación, al capturar especies reactivas de oxígeno. De manera adicional, el efecto vasodilatador resulta de un mecanismo mediado por NO, el cual involucra la fosforilación de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) en la serina 1177. El aumento de NO también retrasa la activación del sistema de angiotensina local y la senescencia endotelial (Holubarsch y col., 2018).

2.9. Sistemas lipídicos como formas farmacéuticas de administración

2.9.1 Sistemas lipídicos

En la actualidad, más de la mitad de los nuevos candidatos a fármacos son poco solubles en agua, por lo que conducen a una baja biodisponibilidad, una alta

variabilidad intra- e interindividual y mala dosificación. Las formulaciones basadas en lípidos han ganado popularidad ya que mejoran la absorción de fármacos lipofílicos. Dentro de estas formulaciones, se encuentran los sistemas de administración de fármacos automicroemulsionables (SAME) o SMEDDS (self-microemulsifying drug delivery Systems). Estos sistemas se caracterizan por formar microemulsiones (ME) después de la administración oral, al entrar en contacto con los fluidos gastrointestinales la mezcla de lípidos/surfactante-co-surfactante que constituyen el SAME (Mohsin, 2012; Shambhu y Amita, 2015).

2.9.2 Microemulsiones

2.9.2.1 Importancia de las microemulsiones

Aunque las microemulsiones (ME) se conocen desde antes, obtuvieron un impulso a partir de 1959, cuando se aplicaron en una amplia variedad de sistemas biológicos e industriales, incluyendo el área farmacéutica. Son denominadas así por su pequeño tamaño de partícula (10 a 100 nm), su estabilidad termodinámica, y por no requerir energía externa (mecánica o sónica) para su formación, siendo estos últimos elementos los que claramente las diferencian de las nanoemulsiones. Las ME son particularmente útiles para solubilizar compuestos insolubles o escasamente solubles en agua, el mayor componente del cuerpo humano, así como también para estabilizar compuestos con baja estabilidad química (Flanagan y Singh, 2006).

Las ME consisten en dispersiones isotrópicas transparentes de baja viscosidad formadas por aceite y agua, mezcla binaria que a su vez es estabilizada mediante una película de moléculas tensioactivas o surfactantes de constitución anfifílica, las cuales juegan un importante papel de barrera molecular y de agente reductor de la energía en la interfase como resultado de tener una parte hidrofóbica y otra hidrofílica. A dicha interfase, suele adicionarse generalmente un co-surfactante (codisolvente), cuya función es ayudar a reducir a prácticamente cero el valor de la tensión interfacial aceite/agua (o/w) o agua en aceite (w/o) para estabilizar la dispersión.

Algunos ejemplos de tensioactivos o surfactantes y co-surfactantes son los siguientes:

a) Surfactantes muy clásicos, también llamados emulsificantes o compuestos anfífilicos: Triglicéridos de ácidos grasos y ésteres de propilenglicol de ácidos grasos, ésteres grasos del ácido láctico y del azúcar de mesa (sacarosa), polioxietilen sorbitán monooleato o polisorbato 80 (Tween[®] 80), monooleato de sorbitán (Span[®]80), etc.

b) Cosurfactantes, que son generalmente alcoholes de cadena corta, cuya ingestión no causa toxicidad, como etanol en bajas cantidades, propilenglicol, así como polietilenglicol y derivados como el monoetiléter de dietilenglicol: Transcutol[®] (HP, uso oral y P, uso tópico), así como el Labrasol[®] (ALF, para uso oral), mezcla de mono-, di- y triglicéridos de PEG-8 [mono- y diésteres de ácidos caprílico (C8) y cáprico (C10)].

La gran popularidad de las ME se debe a su amplio intervalo de manipulación para obtener formulaciones y características *ad-hoc* que mejoren la biodisponibilidad y la farmacocinética de los principios activos (Nastiti y col., 2017). Las ME también pueden ser utilizadas para facilitar o controlar la liberación de fármacos, biomoléculas y extractos naturales, que como compuestos individuales o mezclas poco o completamente insolubles en los fluidos acuosos del tracto gastrointestinal, encuentran en las ME el vehículo adecuado para aumentar su biodisponibilidad (Flanagan y Singh, 2006; Nastiti y col., 2017).

Entre las propiedades de las microemulsiones que hay que determinar y garantizar dentro de ciertos intervalos, se encuentran el tamaño de partícula, el potencial zeta (ζ), el log de P, el índice de refracción y el pH.

2.9.2.2 Propiedades importantes de las microemulsiones

2.9.2.2.1 Estabilidad y tamaño de partícula de las microemulsiones

La diferencia entre una micro- y una nanoemulsión radica, más que en el tamaño de la partícula, en el tipo de estabilidad. Ambas formas farmacéuticas son dispersiones coloidales de escala nanométricas formadas por agua, aceite,

surfactantes y co-surfactantes que se caracterizan por ser transparentes, monofásicas y ópticamente isotrópicas (o sea, con un mismo índice de refracción en cualquier dirección), pero se diferencian en que las microemulsiones tienen estabilidad termodinámica, mientras que las nanoemulsiones gozan de estabilidad cinética y, además, estas últimas no necesariamente son isotrópicas. En ambos casos, el tamaño de las gotas y, en su caso, nanoestructuras como las micelas, se encuentra por debajo de 500 nm, existiendo hasta la fecha algunas discrepancias entre distintos autores en cuanto al intervalo de tamaño que diferencia a unas de otras. Así, para algunos, las dimensiones de las microemulsiones están entre 10 y 400 nm (Nastiti y col., 2017) y las nanoemulsiones, de 20 a 200 nm. Sin embargo, para la IUPAC (Danielsson y Lindman, 1981), las ME pueden estar integradas por gotas de 1 a 100 nm, preferentemente de 10 a 50 nm.

2.9.2.2.2 Potencial Zeta

En la mayoría de los casos, se requiere que las gotas de una microemulsión tengan la suficiente estabilidad, no solo para fines de conservación del aspecto físico del sistema en dispersión y la preservación del contenido de sustancia activa o estabilidad química (o vida en anaquel), sino también para mantener su eficacia e inocuidad. Las partículas de una ME llevan generalmente una carga eléctrica que proviene de ciertos grupos funcionales capaces de ionizarse y generar una superficie cargada. Aunque la carga neta superficial puede ser neutra, a veces ocurre un movimiento constante de cargas, lo cual puede ser determinante para las propiedades de las micro- y nanoemulsiones, en particular, sobre la biodisponibilidad de los fármacos presentes en un medicamento. El parámetro asociado a dicha carga de superficie y que resulta importante como indicador de estabilidad en las ME y nanoemulsiones es el denominado potencial electrocinético o potencial zeta (ζ) (Honary y Zahir, 2013), el cual se refiere a la diferencia de potencial observada y cuantificada entre el medio de dispersión y el límite de la capa difusa de iones de cargas positivas y negativas formada alrededor de las partículas dispersas (para este caso, gotas). El potencial zeta expresa el grado de repulsión

entre las partículas cargadas dentro de la dispersión, en este caso, de la ME. Valores altos de ζ indican partículas altamente cargadas, lo cual previene su agregación por la repulsión entre ellas. En cambio, valores bajos de ζ , son indicativos de que esa repulsión es superada por la atracción y esto aumenta la tendencia de la microemulsión a formar agregados, coágulos o que ocurra la coalescencia y separación de fases (Sahin, 2007). Algunos autores consideran que un valor de ζ de -30 mV es óptimo para la estabilidad de una microemulsión. Por otra parte, se ha descrito que valores de ζ entre ± 20 y ± 40 mV estabilizan el sistema disperso. Eso demuestra que, a pesar de su gran utilidad, el ζ no constituye un parámetro absoluto para determinar la estabilidad (Zhang y col., 2009).

2.9.2.2.3 Índice de refracción

Este parámetro permite corroborar que la estructura de la microemulsión es constante durante cierto tiempo de almacenamiento. Dicho parámetro debe determinarse a diferentes temperaturas y durante un periodo largo (unos seis meses). Si no se encuentran diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las mediciones, la estructura de la microemulsión se considera estable (Cilek y col., 2006).

2.9.2.2.4 Valor de pH

El pH de una formulación farmacéutica está vinculado con la estabilidad de las emulsiones y altera la solubilidad y la biodisponibilidad de los principios activos en el sitio de absorción (Kale y Deore, 2017), de ahí la importancia de determinar este parámetro en la ME para asociarlo posteriormente con los valores de pH con los que se encontrará la ME en su posible tránsito en el tracto gastrointestinal para una administración oral. Por otra parte, es necesario evaluar el efecto del pH sobre la estabilidad física y química de la ME y/o de sus componentes en condiciones de pH simuladas a las existentes en el tracto gastrointestinal, en particular, a nivel de estómago (pH de 1) e intestino delgado (pH de ≈ 6.5).

3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas medicinales han sido utilizadas en la medicina tradicional para tratar diversos padecimientos, incluyendo las ECV (Sharma y Sarkar, 2013). Estas afecciones constituyen uno de los principales problemas de salud tanto en México, como en el resto del mundo. La HTA es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de las ECV y se encuentra clasificada por la OMS como silenciosa, debido a que no causa síntomas perceptibles hasta convertirse prácticamente en crónica (Kjeldsen, 2018; Fuchs y Whelton, 2020). Existen diversos grupos de fármacos que se emplean actualmente para controlar este padecimiento (Flórez, 2014). Sin embargo, su adquisición es muy costosa para la mayoría de los pacientes, además de tener efectos secundarios y eficacia limitada. Por esta razón, se requieren estrategias innovadoras para tratar y prevenir la HTA.

Desde la antigüedad, las hojas, flores y frutas de las especies del género *Crataegus* se han utilizado en la medicina tradicional de varios países para tratar las ECV. Esto ha propiciado el desarrollo de extractos estandarizados en otros países, elaborados a partir de especies de este género, para tratar la insuficiencia cardíaca y la HTA (Alp y col., 2016).

El género *Crataegus* engloba alrededor de 1000 especies distribuidas en todo el mundo, de las cuales 15 pertenecen a México, entre ellas, *Crataegus rosei*. Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo han demostrado que el extracto metanólico de esta especie produce un potente efecto relajante de la aorta aislada de rata. Hasta ahora, se han identificado cuatro ácidos triterpénicos, algunos de los cuales poseen efecto vasodilatador (López-Fitz, 2019).

El presente trabajo estuvo enfocado en profundizar en el estudio fitoquímico del extracto metanólico de las hojas de *Cratageus rosei*, con la finalidad de identificar y cuantificar, al menos, un marcador químico y farmacológico para desarrollar un sistema autoemulsionable conteniendo el extracto estandarizado de *C. rosei* y comprobar así su actividad vasodilatadora y antihipertensiva en comparación con la del extracto original.

Se desarrolló un sistema automicroemulsionable como la forma farmacéutica idónea de un medicamento herbolario para *C. rosei*, debido a la complejidad química del extracto, que presenta simultáneamente compuestos de diferente polaridad, con la ventaja de que al aplicar adecuadamente parámetros fisicoquímicos de formulación como la proporción de extracto-tensoactivo-cotensoactivo-agua, se puede conseguir una forma líquida nanoestructurada que potencialmente permita incrementar la biodisponibilidad de todos sus constituyentes químicos vasorrelajantes, desde los menos polares hasta los más polares, logrando además su estabilidad química y física.

4. HIPÓTESIS

El extracto metanólico de las hojas de *C. rosei*, cuantificado con dos marcadores químicos y farmacológicos seleccionados, puede ser estandarizado en forma de un sistema automicroemulsionable con estabilidad química y termodinámica y ejercer un efecto antihipertensivo.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Identificar el perfil químico del extracto metanólico de hojas de *Crataegus rosei* y desarrollar un sistema autoemulsionable de administración oral a partir de este extracto, con efectos vasodilatador y antihipertensivo.

5.2. Específicos

1. Determinar el perfil químico del extracto metanólico de las hojas de *C. rosei* para identificar sus constituyentes mayoritarios y seleccionar uno o más marcadores químicos y farmacológicos.
2. Implementar y validar un método analítico para la cuantificación del o los marcadores químicos seleccionados.
3. Obtener un extracto cuantificado con base en los marcadores químicos y farmacológicos seleccionados.
4. Realizar estudios de solubilidad del extracto cuantificado en distintos aditivos.
5. Obtener, a partir del extracto cuantificado, un sistema aumicroemulsionable como sistema de dosificación y determinar sus propiedades coloidales, su viscosidad, su capacidad de carga y su estabilidad.
6. Determinar con un modelo murino la toxicidad oral aguda y subaguda del sistema automicroemulsificable.
7. Determinar si el extracto cuantificado y la microemulsión producen un efecto antihipertensivo en ratas con hipertensión inducida por L-NAME.

6. METODOLOGÍA

6.1 Obtención del extracto

El extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei* (EMCr) se obtuvo previo al inicio de este proyecto según la metodología descrita por López-Fitz (2019). El metanol residual después de llevar a sequedad el extracto se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (FEUM 13.0, 2021).

6.2 Estudio químico del extracto metanólico

6.2.1 Identificación de compuestos fenólicos en el EMCr crudo mediante UPLC-DAD-ESIMS

El análisis mediante UPLC-DAD-ESIMS de los compuestos fenólicos presentes en el EMCr se realizó en un sistema cromatográfico compuesto por un cromatógrafo Acquity UPLC clase I acoplado con un detector arreglo de diodos (DAD) y un detector de masas VION IMS QToF con fuente de ionización por electrospray (ESI). El EMCr se disolvió en MeOH de grado espectrométrico de masas a una concentración de 1 mg/mL y se inyectó en una columna BEH C18 (2.1 x 100 mm y 1.7 μ m). La fase móvil consistió en A) acetonitrilo al 5 % y agua al 95 % acidificada con ácido acético a una concentración de 0.0125 N y B) acetonitrilo al 50 % y ácido acético acuoso al 50 % 0.0125 N.

Para la elución, se utilizó el gradiente descrito en la Tabla 3 con un caudal de 0.21 mL/min. La temperatura de la columna se fijó a 35 °C y se inyectaron alícuotas de 2.8 μ L. Se realizó un barrido de absorbancia entre 210 y 600 nm con una detección simultánea aplicada a 214, 280, 320 y 360 nm.

Se emplearon métodos de análisis de ionización negativa y MSE. La fragmentación de baja energía de colisión utilizada fue de 6 eV con una rampa de alta energía de 15 a 45 eV. La masa se escaneó entre m/z 50 y 1000 Daltons. El voltaje del tubo capilar fue de 2 kV, mientras que la temperatura de la fuente fue de 150 °C y la temperatura de desolvatación fue de 400 °C. Se utilizó helio como gas de colisión y desolvatación a un caudal de 50 L/h y 800 L/h, respectivamente. El voltaje del cono

fue de 40 V. Para la precisión de la corrección de masas se utilizó leucina-encefalina (200 pg/L) a un caudal de 10 µL/min como estándar.

La identificación de los compuestos se realizó mediante la comparación del espectro de masas obtenidos con los publicados en PubChem, FooDB versión 1.0, HMDB versión 5.0 y MassBank of North America (MoNA) con una tolerancia de coincidencia de 5 ppm establecida en el software Unifi 1.9 SR.

Tabla 3. Gradiente de elución para el análisis de compuestos fenólicos y flavonoides.

Tiempo (minutos)	Fase A	Fase B
0	100%	0%
2	100%	0%
5	77.5%	22.5%
20	0%	100%
25	100%	0%
35	100%	0%

6.2.2 Fraccionamiento del EMCr

El EMCr se sometió a un proceso de fraccionamiento cromatográfico, del cual se obtuvo una fracción de taninos y otra libre de taninos. Esta última se sometió a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta (CC). En este fraccionamiento, se obtuvieron 435 fracciones, las cuales fueron reunidas en 28 fracciones principales.

6.2.3 Desarrollo del método analítico por medio de HPLC-DAD

El método analítico para la separación y cuantificación de los ácidos triterpénicos se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC), de la marca Waters (Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA), integrado por una bomba cuaternaria modelo e2695 y un detector de arreglo de diodos (DAD) modelo

2998. Como fase estacionaria, se utilizó una columna Zorbax XDB-C18 (4.6 mm X 150 mm, 5 Micron) (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA).

La elución fue isocrática, con una fase móvil formada por 90:10 (metanol:agua acidulada al 0.05 % de ácido acético) y un flujo de 0.4 mL/min. Las inyecciones fueron de 10 µL. La longitud de onda de detección fue a 204 nm y la temperatura se mantuvo constante a 30 °C.

6.2.4 Purificación mediante HPLC-DAD

Los ácidos triterpénicos se purificaron de la fracción rica en esos ácidos (fracciones de la 144 a la 199 reunidas), utilizando el sistema cromatográfico descrito en la sección anterior (ver punto 6.2.3) y escalando a la columna preparativa Zorbax XDB-C18 (21.2 X 150 mm, 5 µm) y al un flujo de 1.2 mL/min.

6.2.5 Identificación de los compuestos purificados

Los compuestos purificados se identificaron por medio de resonancia magnética nuclear (RMN). Se obtuvieron espectros unidimensionales (^1H y ^{13}C) y bidimensionales homonucleares ^1H - ^1H COSY y heteronucleares ^1H - ^{13}C en sus modalidades a un enlace (HSQC, de sus siglas en inglés: Heteronucler Single Quantum Coherence o HMQC: Heteronucler Mutiple Quantum Coherence) y a múltiples enlaces (HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation) en la Universidad de Guanajuato.

6.2.6 Cuantificación de los ácidos triterpénicos identificados

Las cuantificaciones de los ácidos ursólico, maslínico, corosólico y euscáfico se realizaron mediante la elaboración de curvas de calibración, las cuales se obtuvieron con 6 concentraciones diferentes. Las curvas se construyeron con concentraciones de 100 a 1000 µg/mL. Para el ácido oleanólico, que fue de menor rendimiento, su curva de calibración se construyó con concentraciones de 10 a 120 µg/mL. El área bajo la curva obtenida de cada punto se graficó y se estableció la correlación lineal calculando el coeficiente de correlación de Pearson.

Posteriormente, se calculó la concentración de cada ácido mediante interpolación de cada uno dentro de la curva.

6.2.7 Validación del método analítico para la detección y cuantificación de los ácidos euscáxico (AE) y ursólico (AU) en el extracto

La validación del método analítico para la identificación y cuantificación del AE y AU se realizó considerando las directrices reportadas por el Consejo Internacional para la Armonización (ICH) (Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) (ICH, 2005), así como la farmacopea de Estados Unidos (USP, 2020) y la guía de métodos analíticos de México (CNQFB, 2002). Se determinaron los siguientes parámetros:

6.2.7.1 Adecuabilidad

La adecuabilidad del sistema se evaluó con el objetivo de verificar que el sistema de medición funcionara de manera adecuada. Para esto, se inyectó la concentración de 1000 µg/mL del AE y AU de manera independiente ($n = 5$). Posteriormente, se calculó el coeficiente de variación (CV), el factor de capacidad (k') y el número de platos teóricos (CNQFB, 2002). Las fórmulas que se emplean en dichos cálculos se describen a continuación:

Coeficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{S}{y} * 100$$

Donde y : Media aritmética $y = \frac{\sum y}{n}$

Desviación estándar: S

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

n = número de repeticiones.

Factor de capacidad: k'

$$k' = \frac{T_r - T_o}{T_o}$$

Donde: T_r : tiempo de retención, T_o : tiempo muerto (tiempo que tarda en salir de la columna un compuesto no retenido)

Platos teóricos (N):

$$N = 16 \left(\frac{T_r}{W} \right)^2$$

Donde W: ancho del pico

6.2.7.2 Linealidad

La linealidad del método se evaluó mediante curvas de calibración, las cuales se elaboraron con 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ del AE y AU. Cada concentración se realizó por triplicado. La pendiente de la recta, la intersección y el coeficiente de correlación se determinaron mediante un análisis de regresión lineal. La ecuación de regresión se describe a continuación (Arya y col., 2015):

$$y = mx + c$$

donde:

m = Pendiente de la línea

x = Concentración del marcador químico (en $\mu\text{g/mL}$)

y = Área del pico

c = Intersección de la línea recta en el eje y .

6.2.7.3 Límite de detección y límite de cuantificación

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ) de los AE y AU se estimaron en función de las curvas de calibración, utilizando las siguientes ecuaciones (Gao y col., 2018):

$$LD = \frac{3.3 \times SD}{AS}$$

$$LQ = \frac{10 \times SD}{AS}$$

donde:

SD = Desviación estándar de la intersección

AS = Pendiente promedio de las regresiones lineales.

6.2.7.4 Incertidumbre (o precisión)

La precisión del método se representó como la repetibilidad del análisis (precisión intradiaria e interdía) del AE y AU de las concentraciones de 100, 400 y 800 µg/mL en 3 días diferentes. Asimismo, se evaluó la concentración de 800 µg/mL por dos analistas en dos días diferentes. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD) (CNQFB, 2002).

6.2.7.5 Repetibilidad

La repetibilidad se determinó mediante el análisis por triplicado del placebo enriquecido con el AU y AE de las concentraciones de 100, 400 y 800 µg/mL. El % de RSD y el % de recuperación se determinaron en los tres niveles de concentración (USP, 2020; CNQFB, 2002).

6.2.7.6 Robustez

La robustez se determinó con el análisis por triplicado de la concentración de 1000 µg/mL. Los análisis se realizaron modificando la temperatura, la fase móvil y la longitud de onda a 202 y 206 nm (ICH, 2005 y CNQFB, 2002). Los resultados obtenidos se expresaron como el % RSD.

6.3 Desarrollo del sistema automicroemulsionante

6.3.1 Estudio de solubilidad del EMCr

Este ensayo se basó sólo en resultados de la apariencia física visual homogénea (isotropía) que resultara de la mezcla. La solubilidad del EMCr se determinó a temperatura ambiente (≈25 °C) en distintos excipientes lipídicos (aceites,

tensioactivos y cotensioactivos). Se adicionó una cantidad excesiva del extracto en 1 mL de cada componente. Estas muestras se agitaron durante 12 horas en un baño de ultrasonido (Branson 3510) a temperatura ambiente. Posteriormente, las suspensiones se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos y se visualizó la formación de precipitado.

6.3.2 Construcción de diagrama ternario

Considerando los resultados obtenidos de las pruebas de solubilidad, se eligieron los 3 excipientes lipídicos que por apariencia física solubilizaron más al EMCr para elaborar el diagrama ternario. Este diagrama se desarrolló por medio de un diseño reticular simple aumentado con ayuda del programa Minitab®. El área de trabajo se delimitó del 10 al 90 % de cada excipiente.

6.3.3 Prueba de autoemulsificación

A todas las formulaciones obtenidas, se les realizó la prueba de autoemulsificación. Se dispersó 1 mL de cada formulación en 500 mL de agua a una temperatura de 37 °C y con una velocidad de rotación de 50 rpm. Se evaluó el tiempo de emulsificación y la apariencia de cada mezcla. Las mezclas se clasificaron conforme a los siguientes grados:

- Grado A): Nanoemulsión que se forma en un tiempo \leq 1 minuto de apariencia transparente o ligeramente azulado.

- Grado B): Microemulsión de formación rápida con apariencia transparente o color azulado.

Grado C): Emulsión que se forma en un tiempo \geq 1 minuto de apariencia de color blanco azulado.

- Grado D): Emulsión de apariencia turbia y blanquecina con tiempo de dispersión \geq 1 minuto.

- Grado E): Formulaci3n que se dispersa en un tiempo \geq 2 minutos, con apariencia de gl3bulos de aceite visibles (Talegaonkar y col., 2010).

6.3.4 Caracterización de las formulaciones

Todas las mezclas se caracterizaron determinando el pH con un potenciómetro 530 pinnacle (Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, EE.UU), el índice de refracción con un refractómetro modelo REG-6080 (BAUSCH & LOMB, Ontario, Canadá), el tamaño de gota a través de la dispersión estática de la luz con un equipo Horiba LA 960 (Kioto, Japón) y la estabilidad cinética por potencial Z (ζ) a un pH de 6, una temperatura de 25 °C y utilizando un Zetámetro Zetaprobe DT300 (dispersión Technology, New York, USA).

6.3.5 Optimización de la formulación

De acuerdo con los resultados obtenidos, se realizó una optimización utilizando un diseño reticular simple aumentado, reduciendo el área de trabajo de 30 a 60 % de Transcutol® HP, 30 a 60 % de Labrasol® ALF y de 10 a 40 % de Tween® 60.

6.3.6 Estudios de estabilidad física de las formulaciones

Las formulaciones con menor tamaño de gota y potencial Z cercano a ± 30 mV se sometieron a la prueba de estrés termodinámico mediante los siguientes ensayos: centrifugación (6000 rpm por 10 minutos), ciclo de enfriamiento-calentamiento (4 °C y 40 °C) y ciclo de congelación-descongelación (- 21 °C y 25 °C).

6.3.7 Estudios de estabilidad acelerada de las formulaciones

La formulación óptima (con mejores características físicas) se eligió para los estudios de estabilidad acelerada de acuerdo con lo establecido por la USP (apartado 1150 "Pharmaceutical stability") y la NOM-073-SSA1-2015. Para este objetivo, se disolvieron 30 mg del EMCr en 500 μ L del sistema automicroemulsionable (SAME-Cr). Este se depositó en cápsulas de gelatina dura, las cuales se almacenaron en 3 lotes durante 6 meses a una temperatura de 40 °C ± 2 °C, con humedad relativa de 75% ± 5 %. En los tiempos 0, 1, 3 y 6 meses, se determinaron el tamaño de gota, el potencial Z, la viscosidad, el color y se registraron sus espectros de infrarrojo.

6.4 Estudios *in vivo*

6.4.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley con un peso de 200 ± 15 y 250 ± 20 g para las pruebas de toxicidad (aguda y subaguda) y del efecto antihipertensivo, respectivamente. Los animales se adquirieron del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (INB-UNAM), Campus Juriquilla, Querétaro, México. Todos los animales se mantuvieron en condiciones de laboratorio con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y acceso a alimento y agua *ad libitum*. El manejo, cuidado y sacrificio de los animales de laboratorio se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio) y con apego a los lineamientos establecidos por el Comité de Bioética de nuestra Facultad (Núm. de Aprobación CBQ22/117b).

6.4.2 Estudios de toxicidad aguda y subaguda

Las pruebas de toxicidad oral aguda y subaguda se realizaron de acuerdo con las directrices establecidas por la OCDE, específicamente las directrices 423 y 407, respectivamente.

6.4.2.1 Estudio de toxicidad oral aguda por medio de la Directriz 423 de la OCDE

Para el estudio de toxicidad oral aguda, se utilizaron nueve ratas hembra, divididas en tres grupos ($n = 3$). Los animales se sometieron a ayuno de ocho horas con acceso exclusivo a agua. Los grupos 1 y 2 recibieron una dosis única de 300 mg/kg y 2000 mg/kg de peso corporal (pc) del SAME-Cr, respectivamente. El tercer grupo se utilizó como control, el cual solo recibió el vehículo (SAME). Tras cada administración, los animales se mantuvieron en observación continua durante las primeras cuatro horas. Posteriormente, cada 1, 24, 48 horas y diariamente durante 14 días para registrar cambios en el comportamiento o signos de toxicidad y mortalidad (OCDE, 2002). Además, se registró diariamente el consumo de alimento,

la ingesta de agua y el peso corporal de cada animal. Asimismo, se calculó el porcentaje de cambio en el peso corporal.

6.4.2.2 Estudio de toxicidad subaguda por medio de la Directriz 407 de la OCDE

El estudio de toxicidad subaguda se realizó en ratas de ambos sexos, las cuales fueron clasificadas en seis grupos ($n = 10$, cinco hembras y cinco machos). La administración de las diferentes dosis se realizó diariamente durante 28 días por vía intragástrica. Al grupo 1 o control, se le administró únicamente el vehículo (SAME). Los grupos 2, 3 y 4 recibieron las dosis de 300, 500 y 1000 mg/kg pc del SAME-Cr respectivamente. Los grupos 5 y 6 fueron utilizados como grupos satélite para evaluar la reversibilidad de los efectos ocasionados por la sustancia de prueba. El grupo 5 recibió únicamente el SAME sin extracto y al grupo 6, se le administró la dosis más alta de SAME-Cr (1000 mg/kg de pc). Una vez finalizado el estudio, ambos grupos se mantuvieron durante dos semanas más sin administración para evaluar la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de los efectos tóxicos. Además, se registró el consumo diario de agua y alimento, el cambio porcentual en el peso corporal, la aparición de los signos de toxicidad y la mortalidad de los animales (OCDE, 2008).

Cabe destacar que, a todos los animales utilizados en el estudio de toxicidad, se les determinaron los parámetros de biometría hemática y química sanguínea. Adicionalmente, también se registró el peso relativo de los órganos y se realizaron estudios histopatológicos de los órganos principales.

6.4.3 Evaluación de la actividad antihipertensiva del EMCr y del SAME-Cr

Las actividades antihipertensivas del EMCr y del SAME-Cr se evaluaron en ratas con hipertensión inducida con L-NAME. Las ratas fueron clasificadas en 9 grupos ($n=6$), a los cuales se les administró diariamente L-NAME (50 mg/kg pc) por vía intragástrica durante 2 semanas, con excepción del grupo control. A partir de la segunda semana, se coadministró el L-NAME y el tratamiento correspondiente a cada grupo. Los tratamientos se describen a continuación: el grupo 1 o control

recibió agua, el 2, L-NAME (50 mg/kg pc), el 3, L-NAME + captopril (100 mg/kg pc), los 4 y 5, L-NAME + 5 mg/kg pc, el 6 y el 7, L-NAME + 50 mg/kg pc y a los grupos 8 y 9, L-NAME + 500 mg/kg pc del EMCr y del SAME-Cr, respectivamente. La presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) se midió de manera semanal y con al menos cinco lecturas consecutivas, mediante el método no invasivo de manguito de cola en un monitor CODA® (Kent Scientific, Torrington, CT. USA).

6.4.4 Sacrificio de los animales

Los animales utilizados en los estudios farmacológicos y toxicológicos se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg pc). Posterior al sacrificio, se les extirpó la aorta torácica, el riñón, el corazón, hígado y la arteria mesentérica. A la aorta torácica, se le evaluó la reactividad vascular y los demás órganos extirpados se analizaron con técnicas histológicas para descartar la presencia de algún daño ocasionado por la hipertensión arterial inducida.

6.4.5 Reactividad vascular

A la aorta torácica de las ratas, se le retiraron los coágulos y se limpió de tejido conectivo. Posteriormente, la aorta se colocó en solución Krebs-Henseleit (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM NaHCO_3 , 11.7 mM glucosa y 0.026 mM EDTA) y se cortó en anillos de 5 mm. Los anillos se colocaron en ganchos de nicrom y se suspendieron en cámaras de tejido que contenían 10 mL de solución Krebs. Los tejidos se mantuvieron con burbujeo constante de carbógeno a una temperatura de 37 °C y fueron equilibrados a una tensión inicial de 3 g durante 30 minutos. Después del equilibrio, los anillos aórticos se precontrajeron con KCl para confirmar la viabilidad del tejido. Posteriormente, los anillos aórticos fueron lavados con solución de Krebs-Henseleit y fueron contraídos con 1 μM de L-fenilefrina. Cuando la fenilefrina alcanzó el 100 % de contracción, se agregaron concentraciones acumulativas de carbacol (10^{-9} – $10^{-4.5}$ mM). Los cambios de tensión provocados por el carbacol fueron registrados

por un transductor de tensión Grass FT103 (Astro-Med, Inc., West Warwick, RI, USA) conectado a un sistema BIOPAC MP100WSW (Biopac System Inc, Santa Bárbara, California, USA).

6.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar (DE). Las gráficas y curvas se obtuvieron mediante el programa SigmaPlot® 11.0 (Alemania). Posteriormente, los resultados se analizaron con un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), acompañado de la prueba de Tukey para evaluar diferencias significativas entre las medias.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Determinación del metanol residual del EMCr por medio de CG-MS

En el cromatograma del extracto metanólico (EMCr) obtenido previo a esta tesis [descrito en la tesis de maestría de López-Fitz (2019)] (Figura 1A, ANEXO), se puede observar la ausencia del pico del metanol. Por otro lado, se analizó un tubo fortificado con 20 µL de metanol puro (estándar) para comprobar la veracidad del análisis y se observó la aparición de un pico con tiempo de retención de 2.85 minutos. Los resultados obtenidos en este análisis nos indican que el EMCr cumple con los requisitos establecidos por la Farmacopea de Estados Unidos de América (USP) y la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), en los cuales se establece como criterio de aceptación máxima 3000 ppm en las formulaciones farmacéuticas. Este resultado satisfactorio permitió continuar con el estudio de este extracto en animales y desarrollar posibles productos farmacéuticos derivados de este extracto.

7.2 Análisis del EMCr por medio de Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS)

El análisis del extracto metanólico de las hojas de *C. rosei* (EMCr) permitió identificar 5 ácidos fenólicos y 11 flavonoides (Tablas 4 y 5). Estos resultados reafirman la presencia de la (-)-epicatequina (9.48 mg/kg de hoja), rutina (2.717 mg/kg de hoja) y vitexina en esta especie, las cuales habían sido previamente identificadas y cuantificadas en una fracción obtenida del EMCr (Rodríguez-Martínez, 2021). En este sentido, los compuestos descritos no solo se han registrado en esta especie, sino que también se han encontrado en extractos de hojas de otras especies del mismo género. En las especies europeas, se identificaron la vitexina y el hiperósido (Ameen y col., 2023), mientras que, en las especies mexicanas, se encontraron el ácido clorogénico y los flavonoides epicatequina, quercetina y rutina. Cabe mencionar que estos compuestos fueron reportados para *C. glacialor* y sólo los últimos dos se encontraron en *C. mexicana* (Hernández-Pérez y col., 2014; Ornelas-Lim y col., 2021).

Tabla 4. Ácidos fenólicos identificados en el EMCr.

Compuesto	TR (min)	Fórmula molecular	Masa molecular esperada	Picos observados
Ácido 4-hidroxibenzoico	6.14	C ₇ H ₆ O ₂	138.031	137.024 , 93.034
Ácido clorogénico	5.62	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.095	191.056, 135.044, 161.024, 93.034, 85.029
Ácido ferúlico	7.46	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.058	137.024, 193.05 , 175.04, 134.036, 149.024
Ácido <i>p</i> -coumárico	5.74	C ₉ H ₈ O ₃	164.047	119.05, 163.039 , 117.034
Ácido protocatéquico	1.38	C ₇ H ₆ O ₄	154.026	109.029, 108.021, 81.034

La identificación de este tipo de compuestos en un extracto que se ha reportado con actividad vasodilatadora es de gran importancia, debido a que es posible esclarecer su contribución en el efecto vasodilatador total del extracto. En este sentido, de los compuestos identificados en *C. rosei* como la vitexina (E_{\max} : 58.56 ± 3.29 y una CE_{50} de $2.529 \mu\text{g/mL}$), la epicatequina (E_{\max} : 46.30 ± 2.05 y una CE_{50} de $4.72 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$), la rutina (CE_{50} : 5.65 ± 0.31), el ácido clorogénico (E_{\max} : 67 ± 4) y el hiperósido (CE_{50} : 91.3 ± 14.1 y E_{\max} : 92.3 ± 7.7) poseen el efecto vasodilatador reportado, lo cual podría contribuir a sustentar el efecto vasodilatador observado para esta especie (Lopez-Fitz, 2019).

7.3 Desarrollo del método analítico para la cuantificación de ácidos triterpénicos

El método analítico por HPLC para la identificación y separación de los ácidos triterpénicos se desarrolló mediante la búsqueda de las mejores condiciones analíticas, las cuales incluyeron la modificación de la composición y la proporción de las fases móviles, velocidad de flujo y longitud de onda de detección. Los análisis de la fracción del EMCr rica en ácidos triterpénicos mostraron que la mejor

resolución de los constituyentes se lograba con una elución isocrática, utilizando MeOH:H₂O (90:10) como fase móvil y un flujo de 0.4 mL/min. Asimismo, se comprobó que la longitud máxima de absorción era de 204 nm.

Tabla 5. Flavonoides identificados en el EMCr.

Compuesto	TR (min)	Fórmula molecular	Masa molecular esperada	Picos observados
Apigenina	10.78	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.053	269.045 , 117.035, 151.003
Astragalina	7.22	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.101	285.040 , 447.093, 284.033
(-)-Epicatequina	6.13	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.079	289.072 , 245.081, 137.024, 109.029
(+)-Catequina	7.47	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.079	289.072 , 245.081, 125.024, 109.029
Epigallocatequina	6.13	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306.074	137.024, 109.029, 125.024, 165.018
Genisteína	6.14	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.052	159.044, 135.045, 107.05
Hiperósido	6.14	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.095	300.028, 271.025, 301.034, 255.030
Kaempferol	7.98	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.048	285.040, 93.034, 117.034
Luteolina	9.65	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.048	133.029, 175.04, 151.003, 107.014
Morina	7.12	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.042	151.003, 135.008, 148.016
Quercetina-7-O-glucósido	7.12	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.095	463.088, 301.034, 283.025

7.4 Purificación de los ácidos triterpénicos eluidos del EMCr

El método desarrollado para la identificación y cuantificación de los ácidos triterpénicos en el EMCr fue escalado a nivel preparativo. Para esto, se incrementaron en las inyecciones el flujo (1.2 mL/min), el volumen de inyección (800 µL) y la masa de la fracción rica en triterpenos (50 mg). Estas condiciones

mantuvieron la misma resolución cromatográfica observada a nivel analítico, lo cual permitió separar los 12 picos mayoritarios presentes en la fracción (Figura 11). Por otro lado, los compuestos purificados con mayor rendimiento fueron los picos con los TR de 39.96 y de 139.45 min, seguidos de los de 83.72 y 77.22 min y, por último, el de 68.68 min.

Posterior a la purificación, los picos recolectados se analizaron nuevamente utilizando las mismas condiciones. El análisis individual de los compuestos recolectados, con tiempos de retención de 39.96, 77.22, 83.72, 133.13 y 139.45 min mostró cinco picos simétricos y sin desdoblamiento, lo cual nos permitió descartar la presencia de impurezas en cada uno de ellos (Figura 12). Considerando este resultado, a los compuestos puros se les registraron sus espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para su identificación.

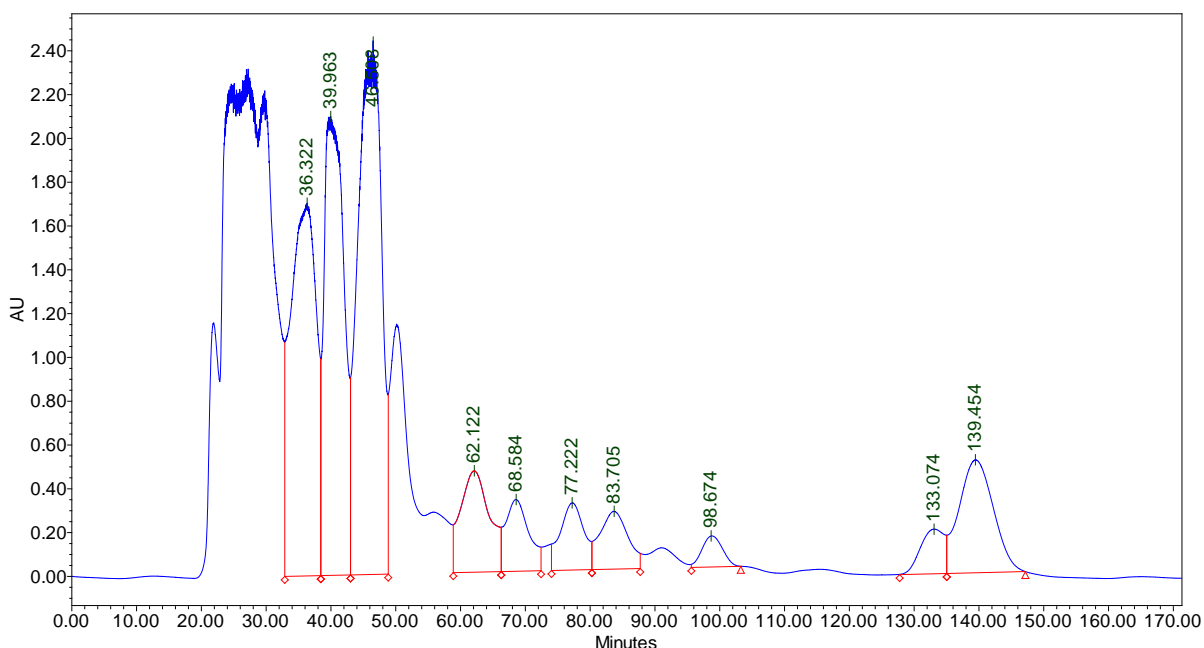


Figura 11. Cromatograma de HPLC-DAD preparativo de una fracción rica del EMCr en ácidos triterpénicos.

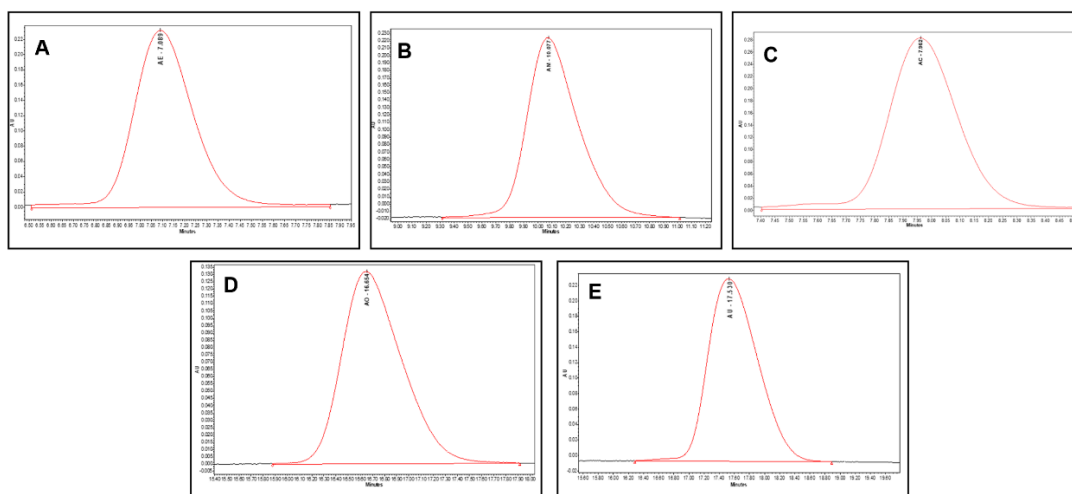


Figura 12. Cromatogramas individuales de los ácidos triterpénicos del EMCr purificados por HPLC-DAD preparativo con tiempo de retención de A) 39.96 min, B) 77.22 min, C) 83.72 min, D) 133.13 min y E) 139.45 min.

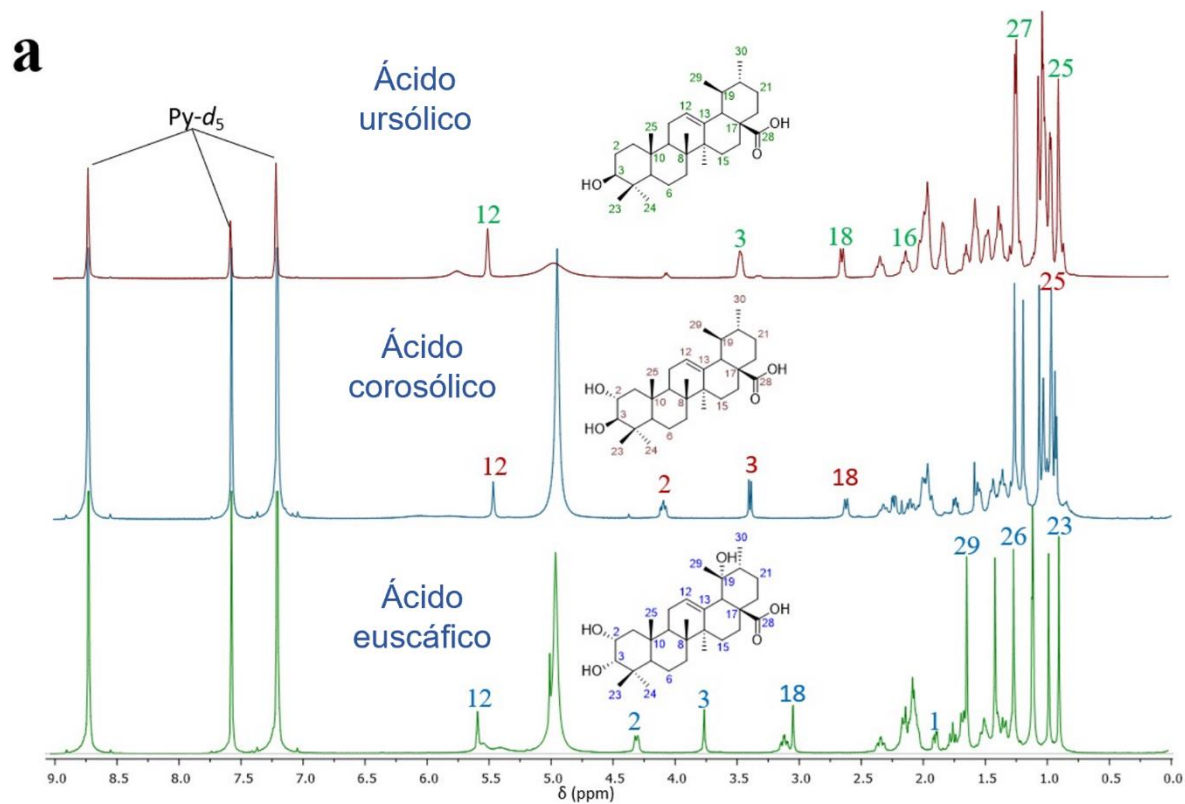
7.5 Identificación de los ácidos triterpénicos del EMCr mediante RMN

Las Figuras 13a y 13b, 14a y 14b ilustran los espectros comparativos de RMN de ^1H y ^{13}C , respectivamente, para los cinco compuestos mayoritarios del EMCr. Sólo se describen aquí algunas señales distintivas importantes.

En los espectros de RMN de ^1H , la señal alrededor de δ_{H} 5.50 (Figura 13) corresponde al protón vinílico (H-12) en todos los compuestos.

Los picos con TR de 39.96, 77.22, 83.72, 133.13 y 139.45 min mostraron en sus espectros de RMN de ^{13}C (Figura 14) 30 señales, de las cuales una cercana a 180 ppm, es característica del carbonilo de los ácidos. Las señales alrededor de δ_{C} 120 y 145 corroboraron la presencia del grupo vinilo en C-12 y C-13 respectivamente. Las principales diferencias en los valores de δ_{H} y δ_{C} entre los cinco compuestos residen en sus patrones de hidroxilación. Por ejemplo, los picos en 133.13 min y 139.45 min solo exhibieron una señal cerca de δ_{H} 3.5 (Figura 13a y b) y δ_{C} cerca de 80-85 ppm (Figura 14a y b), que indican protones sobre carbono monooxigenado y carbonos igualmente monooxigenados respectivamente. En contraste, los picos con de los TR de 83.72 y 77.22 min mostraron dos señales para δ_{H} entre 4.0 y 4.5 (H-2

y H-3) y otras dos en sus RMN de ^{13}C , una δ_{C} de 65-70 (C-2) y otra de 77-83 (C-3). Finalmente, el pico con TR de 39.96 min produjo un singulete para el H-18, indicando carbonos cuaternarios en su alrededor y tres señales entre 65 y 80 ($\delta_{\text{C-2}}$, $\delta_{\text{C-3}}$ y $\delta_{\text{C-19}}$, esta última en δ_{C} 72.5), las cuales son propias de arbonos monooxygenados) (Figura 14a y 14b). Adicionalmente, se obtuvo un espectro de ^{13}C del pico con TR de 68.68 min, el cual presentó impurezas (Figura 2A, ANEXO). Sin embargo, al comparar el desplazamiento químico de las señales con lo reportado en la literatura, se logró identificarlo como ácido alfitólico (Somin y col., 2019). La Figura 15 muestra el cromatogra a nivel preparativo de los tiempos de retención y sus correspondientes compuestos.



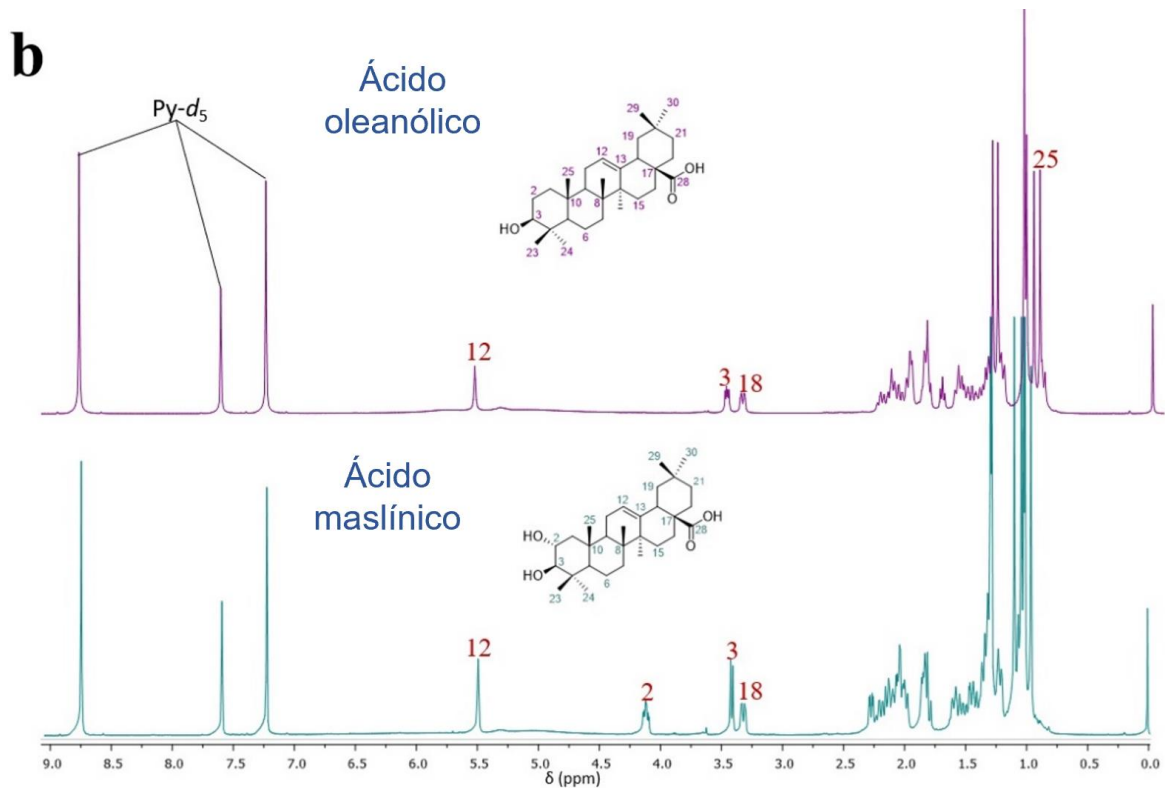


Figura 13. Espectros comparativos de RMN de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de los ácidos ursólico, corosólico y euscáfico (a), así como los espectros de los ácidos oleanólico y maslínico (b) contenidos en el EMCr. Las señales más distintivas se indican sobre los espectros.

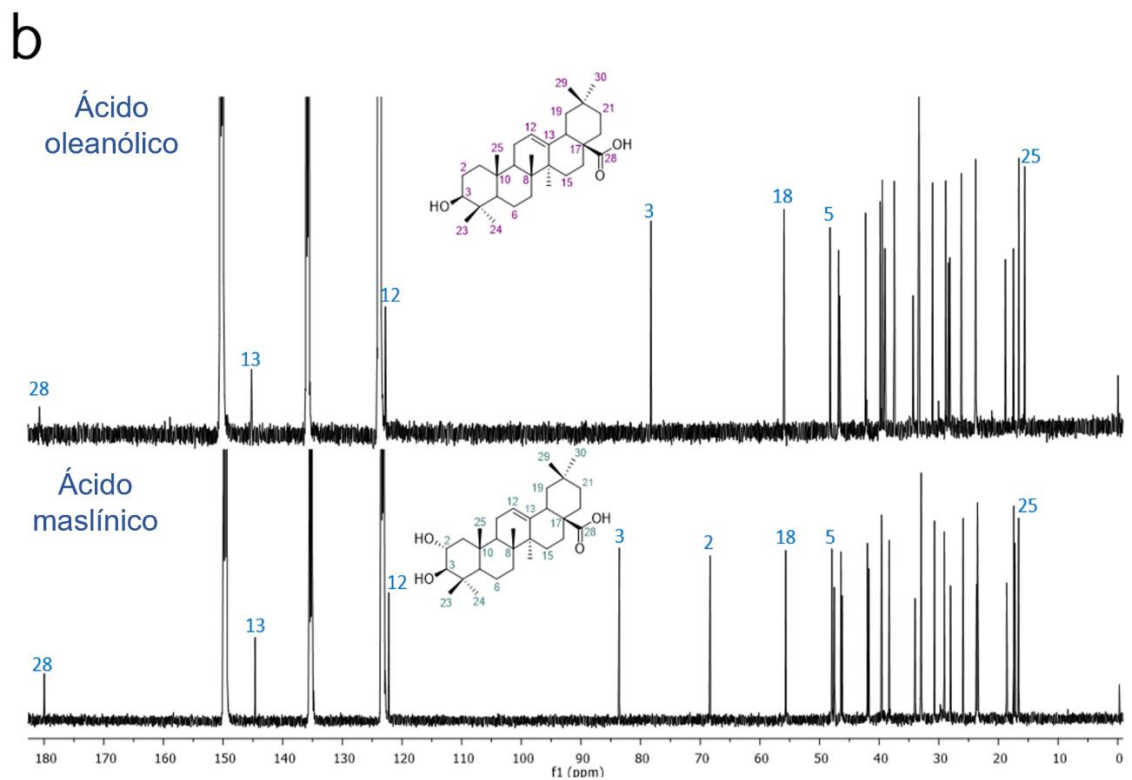
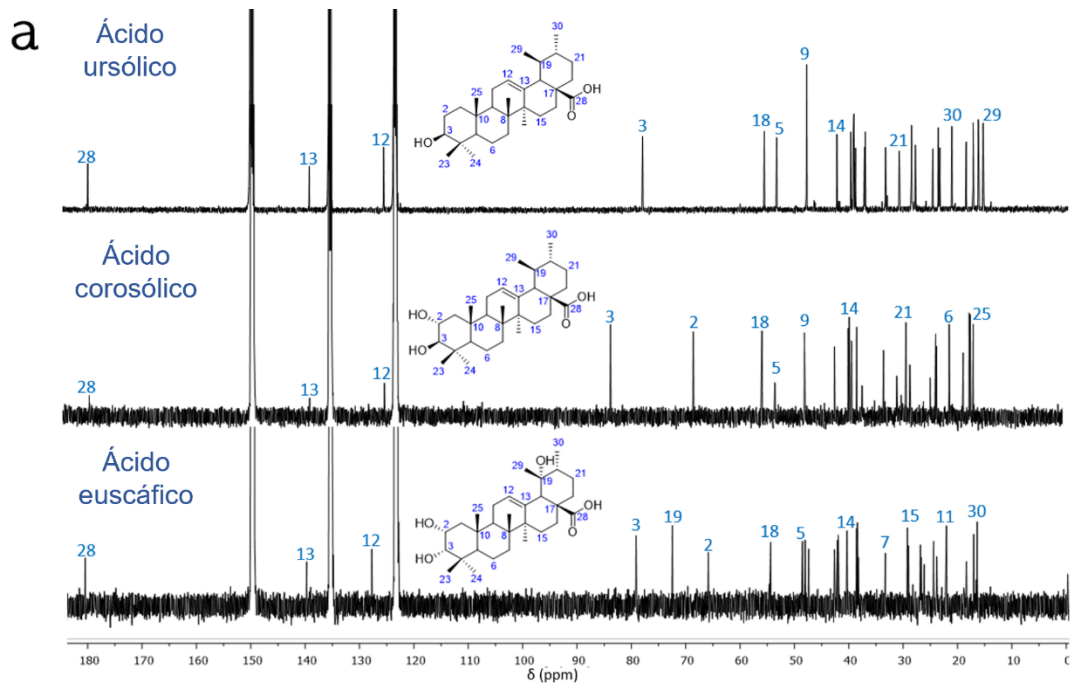


Figura 14. Espectros comparativos de RMN de ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de los ácidos ursólico, corosólico y euscáfico (**a**), así como los espectros de los ácidos oleanólico y maslínico (**b**), contenido en el EMCr

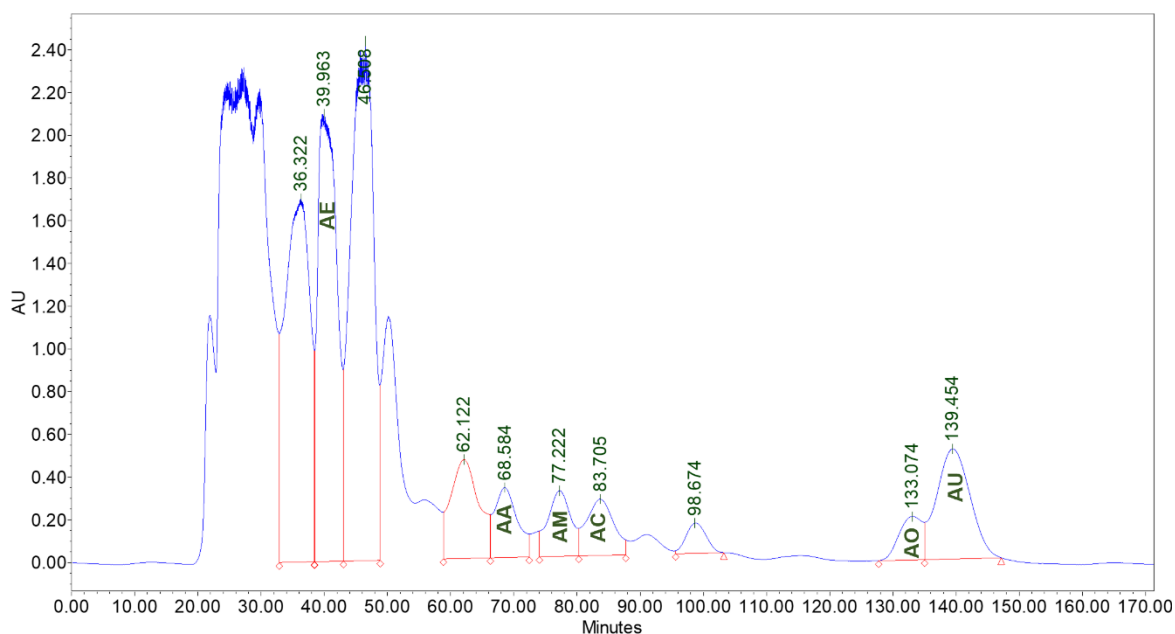


Figura 15. Cromatograma a nivel preparativo de los tiempos de retención y sus correspondientes compuestos. [AE] euscápico, [AM] malísnico, [AC] corosólico, [AO] oleanólico, [AA] alfitólico y [AU] ursólico.

Por otro lado, es importante mencionar que los resultados de este estudio contribuyeron a la identificación por primera vez del ácido oleanólico y alfitólico en las hojas de *C. rosei*. Además, se reafirma la presencia de los otros 4 ácidos triterpénicos que habían sido previamente identificados en esta especie (López-Fitz, 2019). Considerando el grado de pureza de 5 de los 6 ácidos triterpénicos obtenidos mediante el proceso de escalamiento con columna preparativa, estos se utilizaron como estándares y a la vez, útiles como los marcadores analíticos para la validación del método analítico y la cuantificación de estas moléculas en hojas y en el extracto de *C. rosei*.

7.6 Identificación de los ácidos triterpénicos en el EMCr

Por otro lado, la identificación de los cinco ácidos triterpénicos en el extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei* se realizó mediante la comparación de los TR de los estándares y los de los picos presentes en el extracto (Figura 16 A y

B). Asimismo, para la confirmación de la identidad de los ácidos, se realizaron coeluciones del extracto y los estándares obtenidos mediante purificación en nuestro laboratorio. Los análisis de las coeluciones no mostraron desdoblamiento de los picos, lo cual demuestra la presencia del ácido ursólico, oleanólico, maslínico, corosólico y euscáfico. En la Figura 16 **A**, se muestra el cromatograma de la coelución de los estándares de los 5 ácidos en las condiciones analíticas desarrolladas, en el cual se observa el ácido euscáfico con un TR de 5.75 min y la separación del ácido ursólico (TR de 17.7 min) y corosólico (TR: 10.88 min), de sus isómeros, el oleanólico (TR 16.9 min) y el maslínico (TR: 10.3 min), respectivamente. Asimismo, en la Figura 16 **B**, se observa el cromatograma del EMCr con la identificación de estos compuestos. Cabe mencionar que existe un antecedente de la presencia de este tipo de compuestos en algunas especies mexicanas de *Crataegus*. El ácido euscáfico se identificó previamente en *C. gracillior* y *mexicana*, mientras que el ácido ursólico y el corosólico únicamente en *C. gracilior* (Hernández-Pérez y col., 2014; Torres-Ortiz y col., 2020).

7.7 Cuantificación de los ácidos triterpénicos

La cuantificación de los ácidos triterpénicos se obtuvo mediante curvas de calibración de cada compuesto de manera independiente (Figura 17 **A** y **B**). Para el trazado de las líneas de correlación concentración-absorbancia (Figura 17 **B**), se utilizaron seis concentraciones apropiadas para cada compuesto (más detalles en el punto 7.8.3). Todas las curvas mostraron buena linealidad al tener una correlación (R^2) > 0.98 (ICH, 2005). Los límites de cuantificación (LC) y de detección (LD) se calcularon a partir de los resultados obtenidos en las curvas de calibración, los cuales se muestran en la Tabla 6.

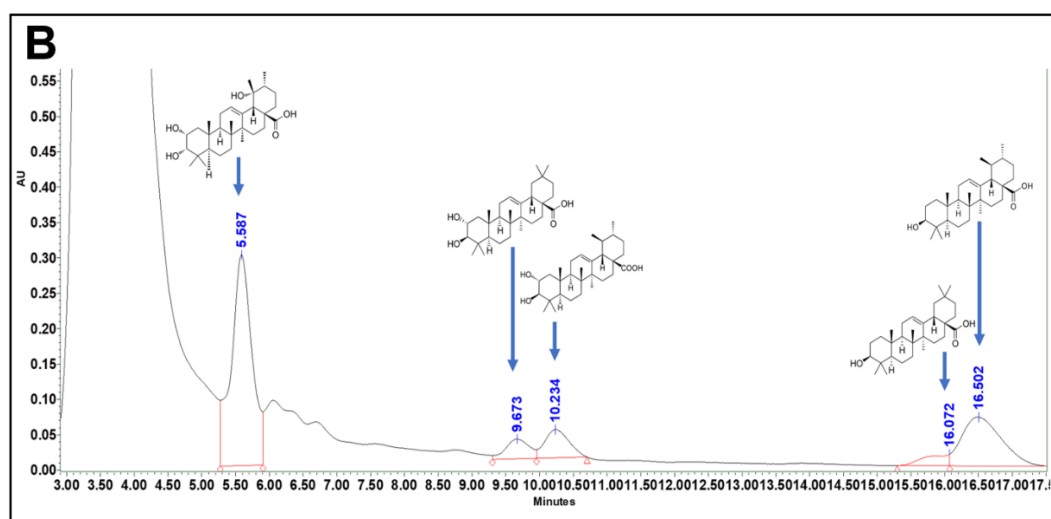
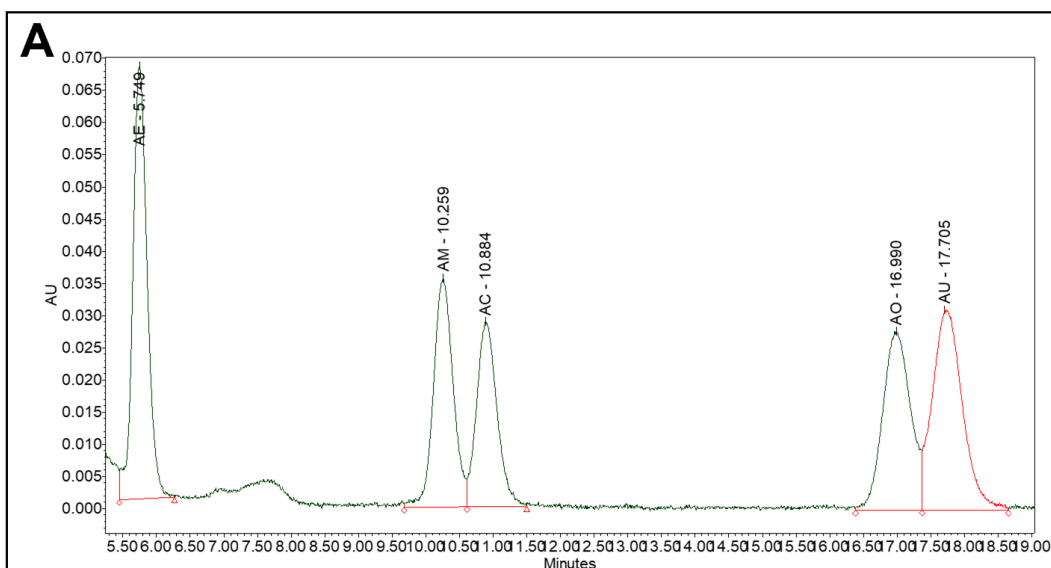


Figura 16. Cromatogramas **A)** de los estándares de los ácidos triterpénicos [AE], [AM], [AC], [AO] y [AU] respectivamente, y **B)** del EMCr con las estructuras químicas de los mismos compuestos.

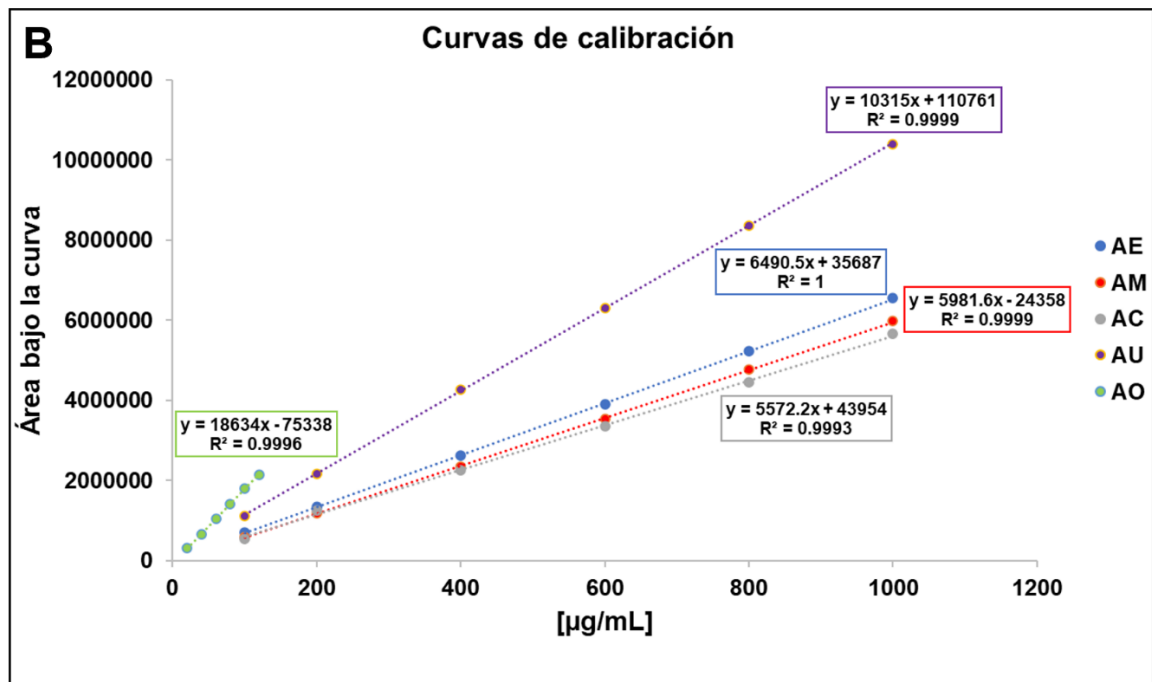
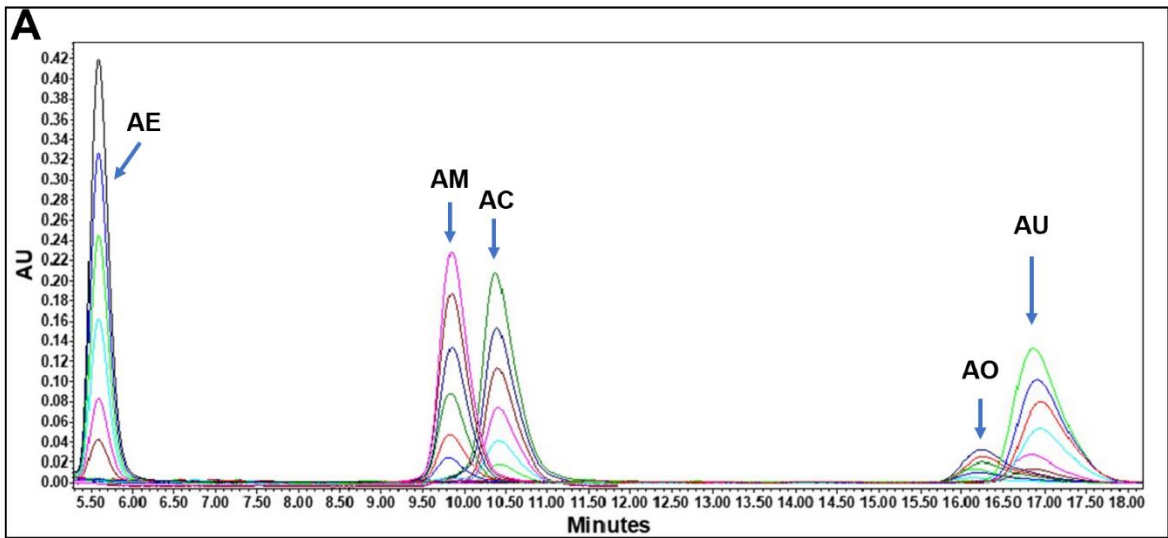


Figura 17. **A)** Cromatogramas para las curvas de calibración **B)** curvas de calibración de los estándares de los ácidos triterpénicos.

Tabla 6. Ecuaciones lineales deducidas de las curvas de calibración, límite de detección y cuantificación.

Compuesto	Concentración (µg/mL)	Ecuación deducida	Correlación (R ²)	LD (µg/mL)	LC (µg/mL)
AE	100-1000	y= 6490.5x + 35687	1	12.26	20.43
AM	100-1000	y= 5981.6x -24358	0.9999	26.42	44.03
AC	100-1000	y= 5572.2x + 43954	0.9993	53.67	89.46
AO	20-120	y= 18634x -75338	0.9996	0.0007	4.2
AU	100-1000	y= 10315x + 110761	0.9999	9.72	16.17

Por otra parte, el escalamiento a nivel de hojas secas mostró que el compuesto mayoritario en el extracto es el AE (19.25 ± 0.24 mg/g de hoja), seguido del AU (11.11 ± 0.41 mg/g de hoja), AC (5.79 ± 0.15 mg de hoja), AM (3.32 ± 0.08 mg de hoja) y AO (1.27 ± 0.1 mg de hoja) (Figura 18). Los resultados de este estudio demostraron que, con respecto a la concentración previamente reportada para los flavonoides (Rodríguez-Martínez, 2021), los ácidos triterpénicos son los compuestos con mayor abundancia en las hojas *C. rosei*.

Además de la alta concentración de los ácidos triterpénicos encontrada en este estudio en las hojas *C. rosei*, se destaca que el AE y el AU también poseen actividad vasodilatadora, con una CE₅₀ no reportada, pero un E_{max} de 83.99 ± 0.003 para el primero y una CE₅₀ de 21.5 ± 3.5 µg/mL, con una E_{max} de 97.7 ± 3.9 %, para el segundo (Al-Habib y col., 2015). Ambos ácidos (AE y EU) cumplen así con los requisitos establecidos por la la Guía para la declaración de sustancias o materiales vegetales y preparaciones herbales en productos medicinales herbolarios y productos tradicionales medicinales herbolarios de la EMA (2010), la cual recomienda la selección de moléculas con alta abundancia para que sirvan como marcadores analíticos y/o aquellos que contribuyen a la actividad farmacológica (Li y col., 2008) o marcadores “activos”. En este sentido, los dos ácidos, el ursólico y el euscáfico se propusieron como los marcadores químicos y farmacológicos idóneos

para esta especie vegetal, cumpliendo ambos la función de marcador tanto analítico como activo.

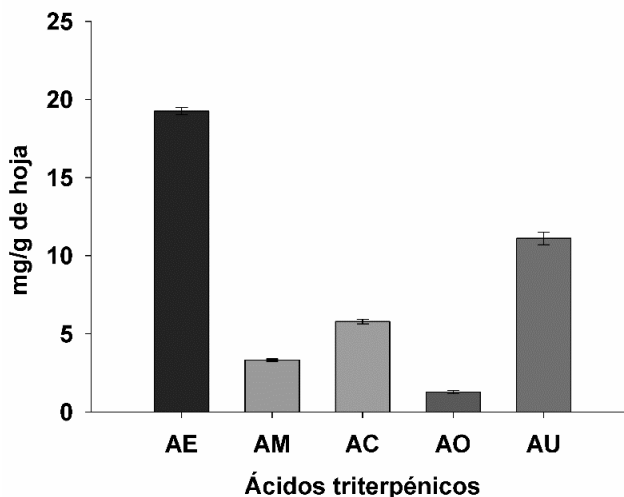


Figura 18. Gráfica de la cuantificación de los ácidos triterpénicos en el EMCr: [AE] euscáfico, [AM] malísnico, [AC] corosólico, [AO] oleanólico, y [AU] ursólico

7.8 Validación del método analítico para la cuantificación del AE y AU en el EMCr y SAME

7.8.1 Especificidad

La especificidad del método analítico por HPLC-DAD se determinó evaluando en primer término la respuesta de los analitos a diferentes longitudes de onda de absorción, realizándose, tanto con los estándares obtenidos de AE y AU como con muestras de EMCr. Los resultados mostraron que el análisis a 204 nm proporcionó una mayor sensibilidad y resolución del método. Por otro lado, la confirmación del AE y AU en los extractos se realizó mediante el enriquecimiento del extracto con los estándares y proporcionando el consiguiente incremento del área bajo la curva. La especificidad de los picos en las muestras se determinó mediante la ausencia de la deformación del pico o la manifestación de un pico contiguo y, por último, se inyectaron blancos (fase móvil) para descartar la interferencia en los tiempos de retención de los dos marcadores químicos.

7.8.2 Adecuabilidad y precisión del sistema analítico

Los resultados de la adecuabilidad revelaron una interacción positiva del AE y AU con la fase móvil y la columna (factor de capacidad $k' > 2$). Así mismo, la columna presentó buena resolución con una eficiencia > 2000 en número de platos teóricos y un coeficiente de variación (CV) $\leq 2\%$. Por otro lado, los resultados para los AE y AU en la precisión del sistema mostraron un CV $\leq 1.5\%$ (Tabla 7) (USP, 2020; FEUM, 2020). Estos resultados demostraron que el sistema cromatográfico se encontró en condiciones óptimas para la validación del método analítico. Por lo tanto, confirmaron la obtención de datos reproducibles y confiables durante los análisis realizados.

Tabla 7. Parámetros de desempeño del AE y AU y criterios de aceptación.

Compuesto	Adecuabilidad				Precisión del sistema
	TR	CV	No. De platos teóricos	Factor de capacidad	CV
AE	5.58 ± 0.003	0.31 %	49871838 ± 63164	4.58 ± 0.004	0.022 %
AU	16.55 ± 0.013	0.41 %	28338273 ± 47627	42.78 ± 0.002	0.58 %
Criterios de aceptación de la FEUM	-	$\leq 2\%$	> 2000	> 2	$\leq 1.5\%$

7.8.3 Linealidad, límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) del sistema analítico

Las curvas de calibración para evaluar la respuesta analítica a la concentración de los marcadores químicos AE y AU se construyeron utilizando seis concentraciones diferentes en el intervalo de 100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, y realizando ensayos independientes por triplicado (Figura 16 A y B). Las curvas obtenidas mostraron buena linealidad con una $R^2 = 1$ y 0.9999, para el AE y el AU, respectivamente. Los datos obtenidos

mostraron una excelente correlación entre las variables y, además, cumplieron con los criterios de aceptación, al obtener una $R^2 > 0.98$ (USP, 2020). Los límites de cuantificación del AE y AU fueron de 20.43 y 19.55 $\mu\text{g/mL}$, mientras que los límites de detección fueron de 12.26 y 11.73 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Tabla 6).

7.8.4 Precisión del método

La precisión intermedia se expresó como el porcentaje de la desviación estándar relativa (% RSD) de los análisis independientes ($n=3$). Se analizó una concentración baja, media y alta (100, 400 y 800 $\mu\text{g/mL}$) en 3 días diferentes. En la Tabla 8, se observan los datos obtenidos del análisis intradía e interdía del AE y AU, los cuales muestran un RSD $< 2\%$. Por otra parte, se analizó la concentración de 800 $\mu\text{g/mL}$ por dos analistas, en dos días diferentes. El análisis intradía e interdía para el AE no mostró un % RSD mayor a 0.9 y para el AU, no mayor a 1.24 % (Tabla 9). Por otro lado, los análisis de repetibilidad y precisión intermedia registraron un % RSD < 2 , lo cual cumple con los criterios de aceptación descritos por la ICH y la Guía del CNQFB México para este parámetro. En este sentido, el método analítico desarrollado es preciso para la cuantificación de los dos ácidos triterpénicos al mostrar resultados con RSD inferiores a 2.0 %.

Tabla 8. Resultado de la precisión en el análisis de los AE y AU.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% RSD							
	Ácido euscáfico				Ácido ursólico			
	Día 1	Día 2	Día 3	Interdía	Día 1	Día 2	Día 3	Interdía
	Intradía				Intradía			
100	0.07	0.08	0.22	0.15	1.02	1.55	0.47	0.99
400	0.03	1.8	0.04	1.69	0.56	1	0.67	0.95
800	0.04	0.82	0.11	0.76	0.21	0.56	1.79	1.22

Tabla 9. Valores de los % de RSD obtenidos del análisis por dos analistas en dos días diferentes.

Analista	Ácido euscáfico			Ácido ursólico		
	Día 1	Día 2	Interdía	Día 1	Día 2	Interdía
	Intradía			Intradía		
1	0.08	0.09	0.09	0.02	1.24	0.385
2	0.09	0.08	0.09	0.01	0.19	0.63

7.8.5 Exactitud

La exactitud del método se calculó mediante la determinación del porcentaje de recobro de la adición al EMCr de tres concentraciones conocidas del AE y AU (100, 400 y 800 µg/mL). El porcentaje de recobro de las tres concentraciones para el AE se presentó entre el 99 y el 101.5 %, con un % RSD medio de 0.32 a 0.8 %, mientras que para el AU, los valores se encontraron entre el 99.1 y el 101.9 % y un % RSD medio de 0.26 a 1.18 %. Por lo tanto, los AE y AU demostraron tener un porcentaje de recobro menor a 102% y un RSD < 2%, lo cual demuestra que el método desarrollado posee precisión y exactitud con baja diferencia entre los resultados (Tabla 10).

7.8.6 Robustez

La robustez se evaluó modificando ligeramente las condiciones analíticas como la temperatura, longitud de onda de detección y proporción de fase móvil. El método para la cuantificación del AE y AU se vio afectado en el cambio de las fases móviles, temperatura y longitud de onda, obteniendo un % RSD < 2 % (Tabla 11). Estos resultados demuestran que el método de análisis es robusto al verse afectado en las concentraciones de los dos ácidos triterpénicos por ligeras variaciones en las condiciones de análisis (Figura 19).

Tabla 10. Resultados porcentaje (%) de recobro del AE y AU al utilizar el método analítico por HPLC.

[]	R	Ácido euscáfico				Ácido ursólico			
		[A] (µg/ mL)	[R] (µg/ mL)	% R	% RSD	[A] (µg/ mL)	[R] (µg/ mL)	% R	% RSD
100	1	100	97.17	99.0	0.77	100	99.5	99.5	1.14
	2	100	98.64	100.5		100	99.07	101.4	
	3	100	98.33	100.2		100	101	101.6	
400	1	400	392.84	99.14	0.32	400	408	102.0	1.18
	2	400	395.4	99.78		400	399.7	99.9	
	3	400	394	99.4		400	407	101.9	
800	1	800	808	101.5	0.8	800	796.3	99.5	0.26
	2	800	796.28	100		800	792.63	99.1	
	3	800	806	101.2		800	796.04	99.5	

*[]: Concentración, R: repetición, [A]: concentración añadida, [R]: concentración recuperada, % R: porcentaje de recuperación, %RSD: % desviación estándar relativo medio.

Tabla 11. Resultados del ensayo de la robustez del método por HPLC, medida como variaciones expresadas en % RSD, de la respuesta en concentración de los analitos AE y AU ante modificaciones de condiciones analíticas

Ácidos triterpénicos	Condiciones del método					
	Método original	Temperatura (°C)	Longitud de onda (nm)		Fase móvil	
	λ= 204, 32 °C, fase móvil 90:10 (MeOH:H ₂ O)	32	202	206	92:08 MeOH:H ₂ O	88:12 MeOH:H ₂ O
AE (%RSD)	0.22	1.2	2.58	3.2	11.72	10.77
AU (%RSD)	0.72	9.02	2.35	2.35	11.76	8.64

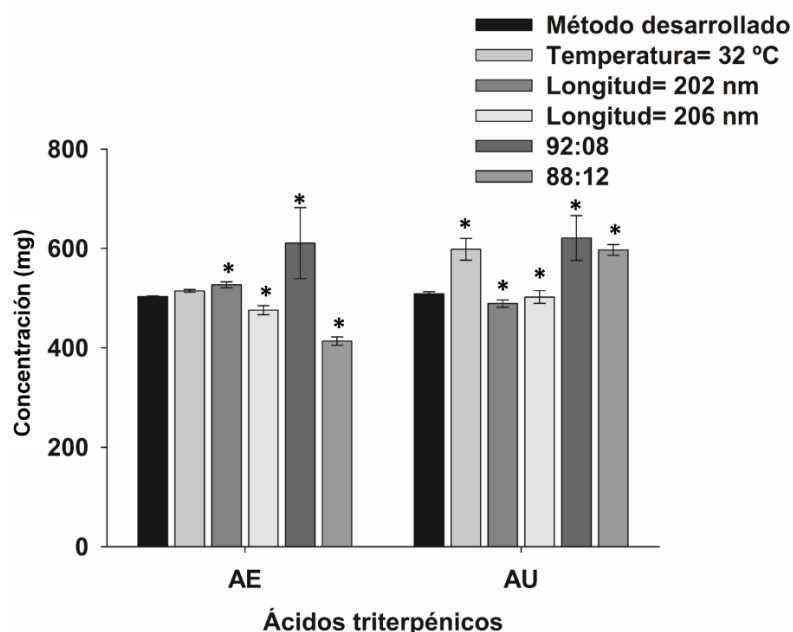


Figura 19. Gráfica que muestra los resultados de la robustez del método por HPLC, evaluada mediante las variaciones en concentración de analitos AE y AU ante modificaciones de las condiciones analíticas señaladas. *Diferencias significativas con respecto al método desarrollado ($p < 0,05$). Las diferencias se determinaron mediante ANOVA de una vía con la prueba de Tukey.

7.9 Desarrollo del sistema automicroemulsionante (SAME) del EMCr

7.9.1 Pruebas de solubilidad del EMCr en diferentes excipientes

La elaboración de un sistema automicroemulsionante (SAME) requiere de la selección de los excipientes ideales para evitar la precipitación del fármaco por cambios en solubilidad. Para esto, se realizaron pruebas de observación visual de la solubilidad del EMCr a temperatura ambiente (≈ 25 °C) en diferentes tensoactivos, cotensoactivos y aceites previamente seleccionados como aditivos potencialmente útiles para constituir un SAME para uso oral. El extracto presentó baja solubilidad en PECEOL®, Lauroglycol®, POCC y Labrafil® M 1944, mientras que en Transcutol® HP se encontró la mayor capacidad de solubilización con más de 150 mg/mL del EMCr; por lo que su función es de codisolvente/cosurfactante. Adicionalmente, el extracto también se logró disolver en etanol (< 10 mg/mL) y en

los surfactantes Tween® 60 (> 10 mg/mL), Tween® 20 (> 10 mg/mL) y Labrasol® ALF (< 10 mg/mL), entre otros aditivos (Tabla 12). Cabe resaltar, que el Transcutol® HP, Labrasol® ALF, Tween® 20 y Tween® 60 fueron los excipientes que disolvieron más al AE y AU.

Tabla 12. Resultados de solubilidad del extracto metanólico y de los marcadores químicos a temperatura ambiente (≈ 25 °C).

Excipientes	Solubilidad aparente (mg/mL)	Cuantificación de marcadores ($\mu\text{g/mL}$)	
		AE	AU
Transcutol® HP	> 150	688.7 \pm 0.2	199.5 \pm 28.2
Labrasol® ALF	Ligeramente < 10	599.6 \pm 16.7	224.3 \pm 10.0
Tween® 60	> 10	549.9 \pm 7.7	134.3 \pm 1.2
Tween® 20	> 10	825.3 \pm 51.9	213.8 \pm 1.9
Lauroglycol® 90	< 10	276.8 \pm 2.2	169.2 \pm 2.2
Lauroglycol® FCC	< 10	137.6 \pm 11.4	116.5 \pm 17.7
LABRAFAC®	< 10	46.5 \pm 10.8	28.4 \pm 0.4
Tween® 80	< 10	1133.0 \pm 34.5	N/D
Capriol® PGMC	< 10	N/D	153.3 \pm 3.8
Capriol® 90	< 10	N/D	173.2 \pm 4.3
Labrafil® M 1944	< 10	N/D	N/D
Labrafac® 1349	< 10	N/D	N/D
Masine® CC	< 10	N/D	N/D
Labrafil® M 1944	< 10	N/D	N/D
Labrasol® 9	< 10	N/D	N/D
POCC	< 10	N/D	N/D
PECEOL®	< 10	N/D	N/D

7.9.2 Construcción del diagrama ternario

De acuerdo con las pruebas de solubilidad del extracto, se seleccionaron el Transcutol® HP (TH), el Labrasol® ALF (L) y el Tween® 60 (TW) como excipientes para desarrollar el sistema lipídico (SAME). El diagrama de fase ternario elaborado con el diseño reticular simple aumentado estableció la proporción ideal de cada componente (del 10 al 90 %) para cubrir la mayor área de trabajo. El diseño mostró

10 combinaciones (M1-M10), las cuales incluían 6 puntos en los bordes, 1 en el centro y 3 entre el centro y el vértice (Figura 19). Por ejemplo, la formulación M1 contenía 80 % de transcutool HP, 10 % labrasol ALF y 10 % de tween 60.

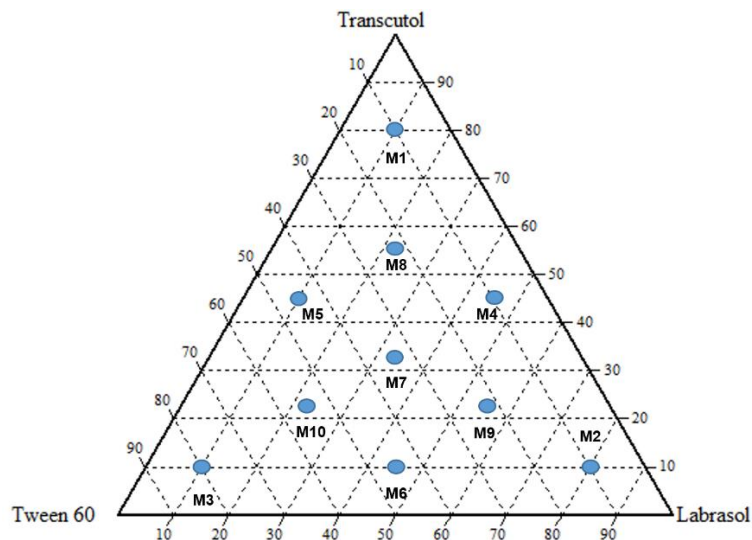


Figura 20. Diagrama ternario que muestra las proporciones de los aditivos lipídicos anfífilos utilizados para integrar las formulaciones M1 a M10 que fueron evaluadas (caracterizadas) en su capacidad de formar un SAME.

7.9.3 Caracterización de las muestras de SAME obtenidas con el diseño reticular simple aumentado

7.9.3.1 Prueba de autoemulsificación

Las 10 formulaciones de SAME elaboradas (M1 a M10) mostraron completa miscibilidad entre los tres aditivos en las proporciones del diagrama de la Figura 20. Cada formulación se sometió a la prueba de autoemulsificación con agua para observar su capacidad de autoemulsificación y determinar a qué clasificación correspondía en función de los grados A – D (Talegaonkar y col., 2010). La formulación M3 (Transcutol® HP: 10 %, Labrasol® ALF: 10 % y Tween® 60: 80 %) presentó separación de fases, por lo que se descartó su utilización en pruebas posteriores. Este comportamiento puede atribuirse a que la alta proporción (80%) de Tween® 60 y baja cantidad (10%) de Transcutol®, siendo ambos compuestos

hidrosolubles, se mezclaron fácilmente con el agua, infiriéndose incluso, por sus valores de concentración micelar crítica (CMC), que son de 0.03 – 0.1 mM y de 2.5%, para el Tween® 60 y el Transcutol®, respectivamente (Javadzadeh y col, 2015; Viada y col. 2018), que la mayor solubilidad aparente en agua de ambos excipientes y su separación del Labrasol®, pudo haber sido resultado de rápida formación de micelas de Tween® 60, debida a su concentración de exceso en el agua; de modo que no se vio favorecida la interacción de éste con el Labrasol® para formar una emulsión. Esto último tendría que comprobarse con otros estudios, utilizando entre otros, un microscopio.

Las formulaciones M2 (80% Labrasol®, 10% Transcutol® y 10% Tween®), M4 (45% Labrasol®, 45% Transcutol® y 10% Tween®) y M10 (22.5% Labrasol®, 22.5% Transcutol® y 55% Tween®), autoemulsionaron y se clasificaron en el grado C por presentar apariencia opaca aun cuando su tiempo de emulsificación fue < 1 minuto; indicando la formación de gotas de escala micrométrica. Si bien fue rápida la formación de estas emulsiones, no fueron estables. Por último, las formulaciones restantes presentaron apariencia transparente y una formación rápida y fueron clasificadas en el grado A de autoemulsificación (Tabla 1A, ANEXO).

7.9.3.2 Determinación del pH, índice de refracción (IdR), tamaño de gota (TG) y potencial Z de los sistemas lipídicos

Todas las formulaciones o SAME presentaron un pH de 7 y un valor de IdR entre 1.43 y 1.45 antes del ensayo de autoemulsificación con agua. Por otra parte, a las 9 formulaciones miscibles autoemulsificadas con agua, se les determinó el tamaño de gota y potencial Z. Las formulaciones M5, M6 y M10 exhibieron el mayor tamaño de gota (> 3000 nm), mientras que las M1, M4, M7 y M9 presentaron un tamaño de gota < 400 nm. Por otro lado, para comprobar la estabilidad, a las 4 formulaciones con menor tamaño de gota, se les determinó el potencial Z, resultando dicho parámetro entre los valores 11 y 14 mV (Tabla 1A). Las formulaciones que obtuvieron estos valores de potencial Z se consideran estables debido a la capacidad de repulsión entre las partículas presentes en la solución, lo cual impide

la formación de aglomeraciones. Estos datos demuestran que las partículas se encuentran dispersas y homogéneas en solución.

7.9.4 Optimización y caracterización de las formulaciones (M11-M20)

La optimización se realizó por medio de un diseño reticular simple aumentado. Esta optimización redujo el área de trabajo en aquellas proporciones de excipientes que permiten la formación de microemulsiones, pero que a su vez reducen el riesgo de irritación gástrica y citotoxicidad, ya que la mayoría de las publicaciones recomiendan no superar la proporción de tensoactivos del intervalo de 30 a 60% en una formulación (Londoño-Ruiz y col., 2022; Uttreja y col., 2025). El área de trabajo delimitó la proporción de Transcutol® HP del 30 al 80 %, de Labrasol® ALF del 30 al 60 % y de Tween® 60 del 10 al 35 %. Este diseño generó 10 nuevas formulaciones (M11-M20), las cuales fueron caracterizadas y clasificadas con los parámetros descritos en el apartado anterior. La formulación M13 presentó separación de fases y se clasificó en el grado E, por mostrar nula dispersión en agua. Por otro lado, las formulaciones M11, M12 y M14 presentaron apariencia opaca, por lo que se clasificaron de grado B y las demás formulaciones se clasificaron en el grado A. No obstante, las formulaciones M15, M16, M17, M19 y M20 presentaron tamaño de gota < 160 nm, un tiempo de emulsificación < 30 segundos y un potencial Z entre 2 y 6 mV (Tabla 2A, ANEXO).

Las gráficas de contorno y superficie revelaron que las formulaciones con una concentración > del 20 % de Tween® 60 presentaron mayor tamaño de gota y las formulaciones con mayor concentración de Transcutol® HP y Labrasol® ALF son las que presentaron menor tamaño de gota. En la Figura 21 A, se observa el diagrama ternario acompañado de la gráfica de contorno de las 20 formulaciones. En esta gráfica, se observa en color verde claro el área de las formulaciones con menor tamaño de gota (< 200 nm) y menor índice de polidispersidad (< 0.2). La gráfica de superficie (Figura 21 B) muestra un comportamiento directamente proporcional entre la concentración de TW y el tamaño de gota (TG) e índice de

polidispersidad (> 1.5 y $TG >$), mientras que en el transcutool HP y labrasol ALF, poseen un comportamiento inversamente proporcional a las mismas variables.

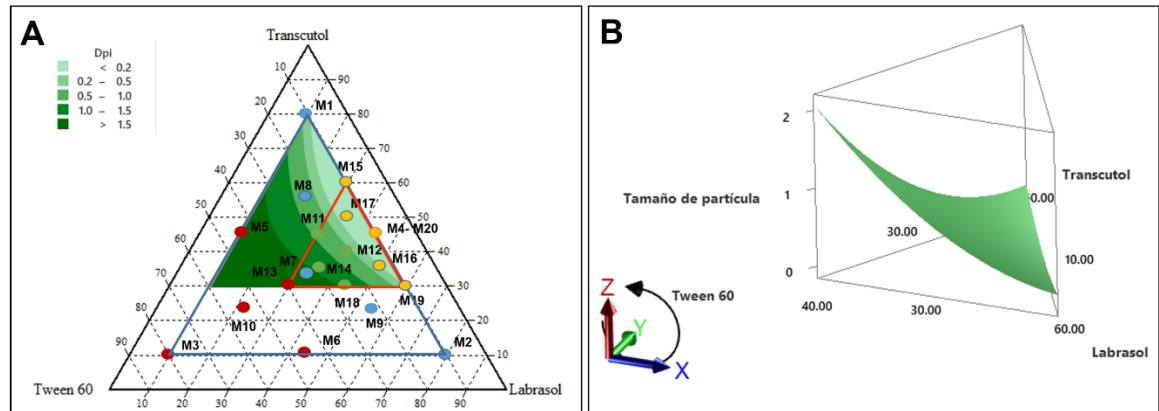


Figura 21. **A)** Diagrama ternario con gráfica de contorno de muestra, **B)** gráfica de superficie.

7.9.5 Estudio de estabilidad física y de emulsificación a pH = 1.2 y 6.8

Las cinco formulaciones con características de microemulsión (tamaño de gota < 200 nm y potencial Z cercano a ± 30 mV) se sometieron al estudio de estabilidad termodinámica. En la prueba de centrifugación, únicamente la formulación M19 presentó precipitación del extracto por lo que esta se descartó. En la prueba de enfriamiento y calentamiento, ninguna formulación presentó separación de fases o precipitación del extracto. En la prueba de congelación y descongelación, la formulación M16 presentó precipitación y también fue descartada. Las tres formulaciones restantes cumplieron la prueba y fueron seleccionadas para la evaluación de autoemulsificación a pH de 1.2 y 6.8. Los resultados de este ensayo revelaron que ninguna de las tres formulaciones mostró precipitado ni separación de fases a estos pH. Sin embargo, la formulación M17 fue la que obtuvo menor tiempo de dispersión en ambos valores de pH (Tabla 13). Con base a estos resultados, la M17 fue seleccionada como la formulación ideal, ya que cumple con las características de una microemulsión (tamaño de gota de 106.8 nm, potencial Z de 5.28 y tiempo de dispersión de 18 segundos).

Tabla 13. Resultados del estudio de la estabilidad cinética de las formulaciones.

Formulación	Prueba de estabilidad			Prueba de autoemulsificación (segundos)	
	Centrifugación*	Enfriamiento/calentamiento	Congelación/descongelación	pH: 1.2	pH: 6.8
M15	√	√	√	17 ± 2	10.5 ± 0.70
M16	√	√	X	---	---
M17	√	√	√	13 ± 1.73	13 ± 0
M19	X	---	---	---	---
M20	√	√	√	14 ± 1.41	16 ± 1.4

* √: Formulación estable

X: Formulación inestable (descartada)

Por otro lado, el análisis de la formulación M17 cargada con 60 mg del EMCr, utilizando Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), mostró gotas con un tamaño inferior a los 50 nm (Figura 22). Las gotas que contenían el EMCr se observaron de forma esférica con superficie lisa y no se encontró agregación o adhesión entre las gotas. En la Figura 22 **A** y **C**, se observan gotas definidas con tamaño homogéneo y sin presencia de aglomerados en escala de 50 nm. En **B** y **D**, se observan gotas con tamaño uniforme y sin agregación en escala de 200 y 100 nm, respectivamente. Estos datos concuerdan con el potencial Z registrado anteriormente. Las microemulsiones son sistemas termodinámicamente estables, pero su estabilidad puede verse comprometida por diversos factores. Cuando esta estabilidad se compromete, las partículas en el sistema interactúan entre sí y pueden conducir a la formación de aglomerados. En este sentido, el SAME-Cr desarrollado presenta estabilidad y evita la agregación.

7.9.8 Estabilidad acelerada

El EMCr se disolvió en el sistema automicroemulsionante (conjunto que se nombró como SAME-Cr) y posteriormente, se incorporó en cápsulas de gelatina dura. Estas cápsulas se almacenaron a 40 °C con 75 % de humedad relativa (HR). Los

resultados de la estabilidad acelerada no mostraron diferencias significativas en el tamaño de gota, potencial Z, infrarrojo y viscosidad a esa humedad y temperatura (Figura 23 **A**, **B**, **D** y **F**).

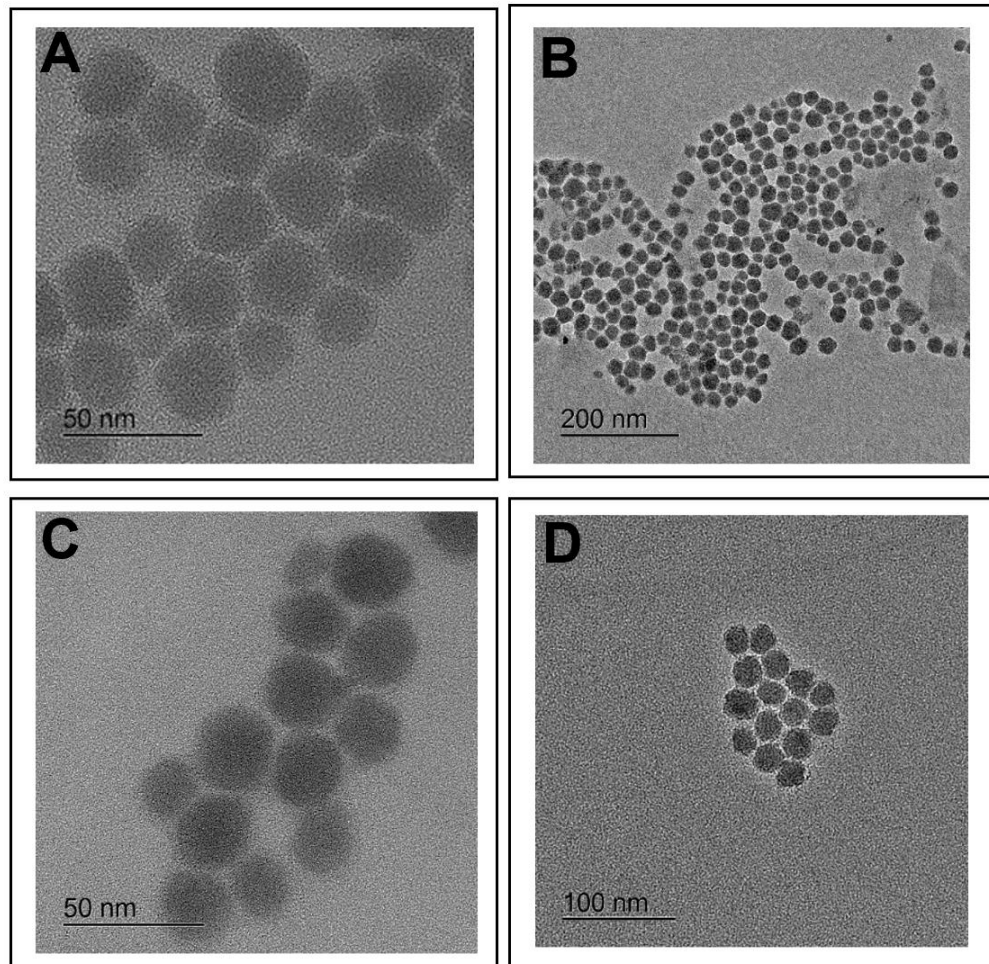


Figura 22. Imágenes capturadas de la MET de las gotas del SAME-Cr.

Sin embargo, los parámetros de color e índice de refracción se vieron afectados por la temperatura de almacenamiento, mostrando diferencia significativa (Figura 23 **C** y **E**). Cabe resaltar que, a pesar de presentar estos ligeros cambios en el color e índice de refracción ocasionados por la temperatura, la composición química y en particular los marcadores químicos del extracto no se vieron afectados, ya que el perfil químico por medio de HPLC e IR no mostró picos y bandas diferenciales respectivamente, con respecto al mes cero.

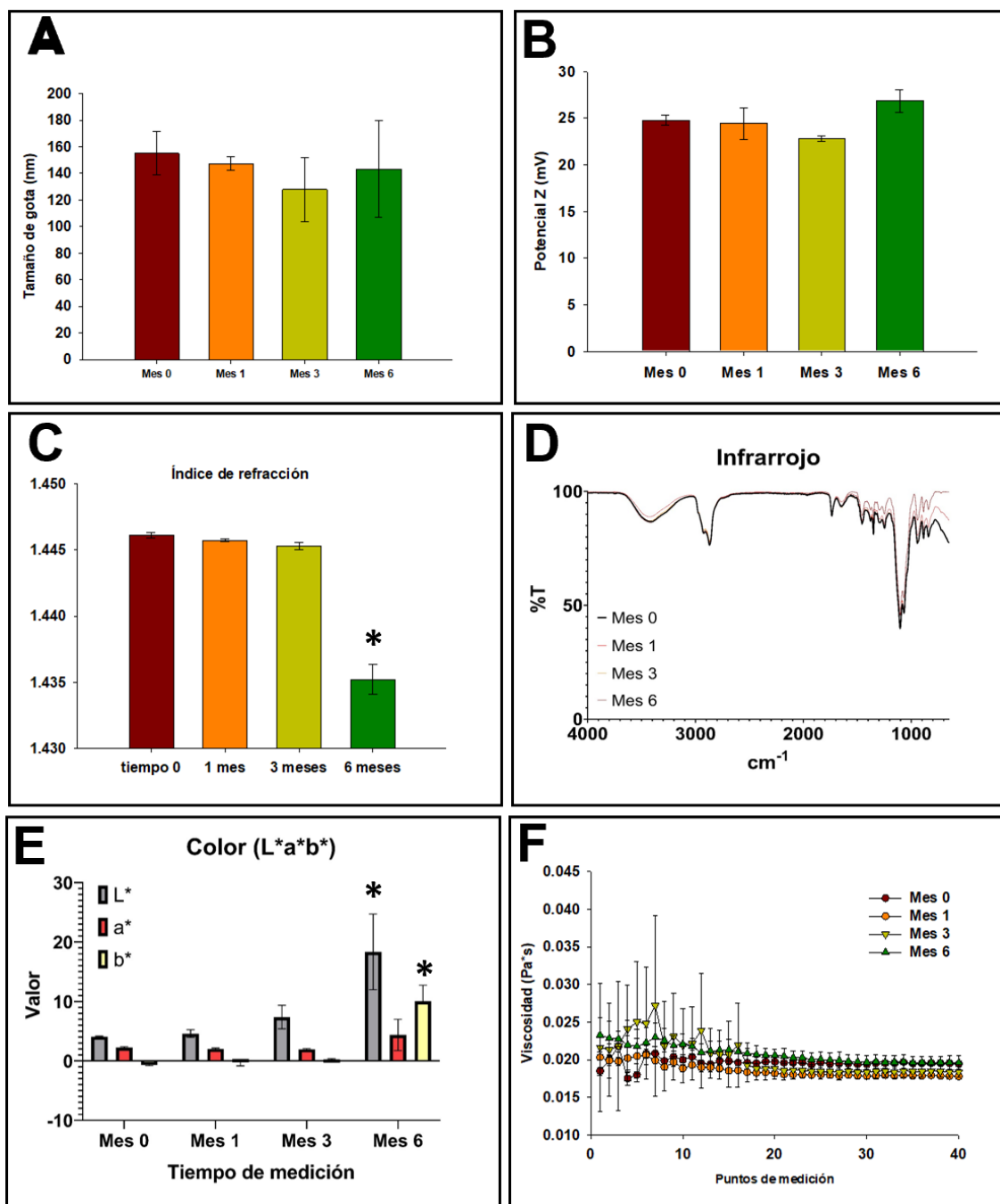


Figura 23. Gráficas de estabilidad acelerada, **A)** Tamaño de gota, **B)** Potencial Z, **C)** Índice de refracción, **D)** Infrarrojo, **E)** Color y **F)** Viscosidad. Los resultados se expresan como la media \pm DE ($n=3$). *Diferencias significativas con respecto al mes cero ($p < 0,05$). Las diferencias se determinaron mediante ANOVA de una vía con la prueba de Tukey.

7.10 Estudio de toxicidad

7.10.1 Toxicidad aguda

En la prueba de toxicidad aguda, no se registraron muertes ni signos de toxicidad aparente durante los 14 días posteriores a la administración única de las concentraciones del SAME-Cr de 300 y 2000 mg/kg de peso corporal (pc). Por otro lado, se descartó la presencia de alteraciones en la conducta, desorientación, letargo, hipoactividad, convulsiones, piloerección, dolor, vómito, diarrea y secreciones anormales en los animales. Asimismo, no se observaron alteraciones significativas en el consumo de agua y alimento en ninguno de los grupos. Cabe mencionar que se observó un aumento de peso corporal al final de la primera y segunda semana tanto en el grupo control como en los dos grupos de tratamiento. No obstante, no se observó diferencia significativa en el aumento del peso corporal semanal entre los grupos control y de tratamiento como se muestra en la Figura 24.

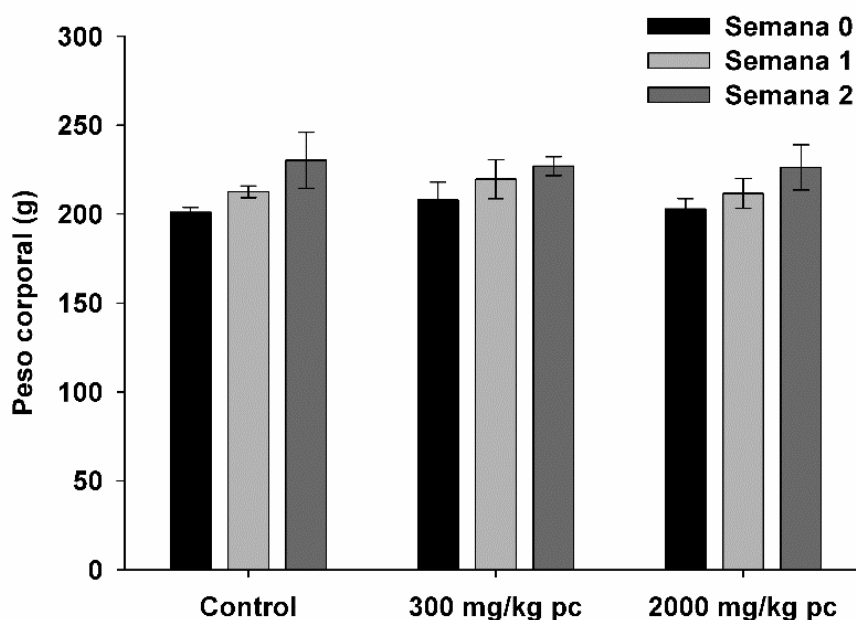


Figura 24. Gráfica del peso corporal del grupo control y de los animales tratados con las concentraciones de 300 y 2000 mg/kg pc. Los resultados se expresan como la media \pm DE ($n=3$).

La administración única de SAME-Cr en dosis de 300 y 2000 mg/kg de peso corporal tampoco presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) en los parámetros hematológicos de los leucocitos, como neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos de los animales tratados con respecto a los del grupo control. Además, no se observaron cambios en los marcadores normales de la función renal (urea y creatinina) ni hepática [fosfatasa alcalina (FA), bilirrubina, alanina transaminasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y globulina] en los grupos tratados (Tabla 14). Asimismo, la necropsia macroscópica de los órganos de los animales no mostró daño aparente y se descartó de manera visual necrosis, formación de edemas, hematomas y hemorragias en los tejidos. Por otro lado, no se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el peso absoluto y el peso relativo de los órganos de los grupos tratados y los del control.

Tabla 14. Parámetros de química sanguínea del estudio de toxicidad.

Parámetros*	Control	300 mg/kg pc	2000 mg/kg pc
FA (U/L)	319.33 ± 68.7	295 ± 6.9	327.3 ± 60.2
ALT (U/L)	46.53 ± 6.9	37.2 ± 3.9	53.4 ± 11.4
AST (U/L)	171.7 ± 33	130.4 ± 39.4	149.2 ± 52.1
Creatinina (mg/dL)	0.4 ± 0	0.4 ± 0	0.33 ± 0.1
Bilirrubina total (mg/dL)	0.25 ± 0	0.25 ± 0	0.25 ± 0
Bilirrubina directa(mg/dL)	0.08 ± 0	0.08 ± 0	0.08 ± 0
Globulina (g/dL)	0.05 ± 0.02	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.14
Urea mg/dL	33 ± 8.7	30.3 ± 4	36.7 ± 4.9
Albumina (g/dL)	3.3 ± 2.2	3.02 ± 1.9	3.23 ± 2.2

Los cortes histológicos de riñón, hígado, bazo, pulmón, cerebro y corazón no mostraron cambios en la morfología de estos órganos, ni daño estructural en las unidades funcionales de los órganos de los grupos tratados con SAME-Cr y los del control. Estos resultados permitieron calcular una dosis letal 50 (DL₅₀) superior a 2000 mg/kg pc, lo cual clasifica al SAME-Cr en la categoría 5 de acuerdo con el Sistema Globalmente Armonizado para el Etiquetado de Productos Químicos (SGA) (United Nations, 2023). Por otro lado, La DL₅₀ del SAME-Cr calculada en este

estudio coincide con lo reportado previamente para otras especies del género *Crataegus*. Por ejemplo, el extracto estandarizado WS1442 posee una DL₅₀ estimada de 1750 mg/kg pc en ratas, mientras que el extracto acuoso de *C. azarolus* reveló una DL₅₀ de más de 2000 mg/kg pc en ratones (Schlegelmilch y Heywood, 1994; Shatoor, 2011).

7.10.2 Toxicidad subaguda

La administración repetida del SAME-Cr con dosis de 300, 500 y 1000 mg/kg pc no mostró signos de toxicidad aparente, ni se registró mortalidad en los animales tratados, en ambos sexos. En relación con la ganancia de peso corporal de los animales, no se reportó disminución en el consumo de alimento en los grupos en tratamiento, satélite y control. Sin embargo, el análisis estadístico mostró un aumento significativo en el porcentaje de peso corporal en la segunda semana del tratamiento en los machos del grupo administrado con dosis de 1000 mg/kg pc. Este aumento se puede asociar con un comportamiento normal, ya que los animales de ese grupo registraron un peso inicial superior al resto de los grupos. En las hembras, se registró una diferencia significativa durante las primeras tres semanas del estudio en los grupos administrados con 300 y 500 mg/kg. Por otro lado, únicamente el grupo de 1000 mg/kg presentó diferencia significativa en la tercera y cuarta semana (Figura 25). Adicionalmente, estos grupos registraron el mayor consumo de alimento durante las cuatro semanas de tratamiento. Este aumento de peso corporal denota un comportamiento normal y un signo de bienestar en los animales, en su salud y en su manejo a lo largo del estudio.

7.10.2.1 Parámetros de química sanguínea y biometría hemática

El estudio de la biometría hemática permitió evaluar el estado general de los animales en cuanto al transporte sanguíneo y sistema inmunitario. Los parámetros de la biometría hemática no se vieron afectados por la administración de SAME-Cr en dosis repetidas con excepción del grupo de 1000 mg/kg pc en las hembras, en el cual se mostró un aumento constate en porcentaje de los monocitos. Sin

embargo, en los grupos satélite y control, no se observó una diferencia significativa, lo cual muestra la reversibilidad de la toxicidad. Estos datos descartaron la presencia de trastornos sanguíneos como anemia y leucemia, así como procesos infecciosos (Tablas 3A y 4A, ANEXO).

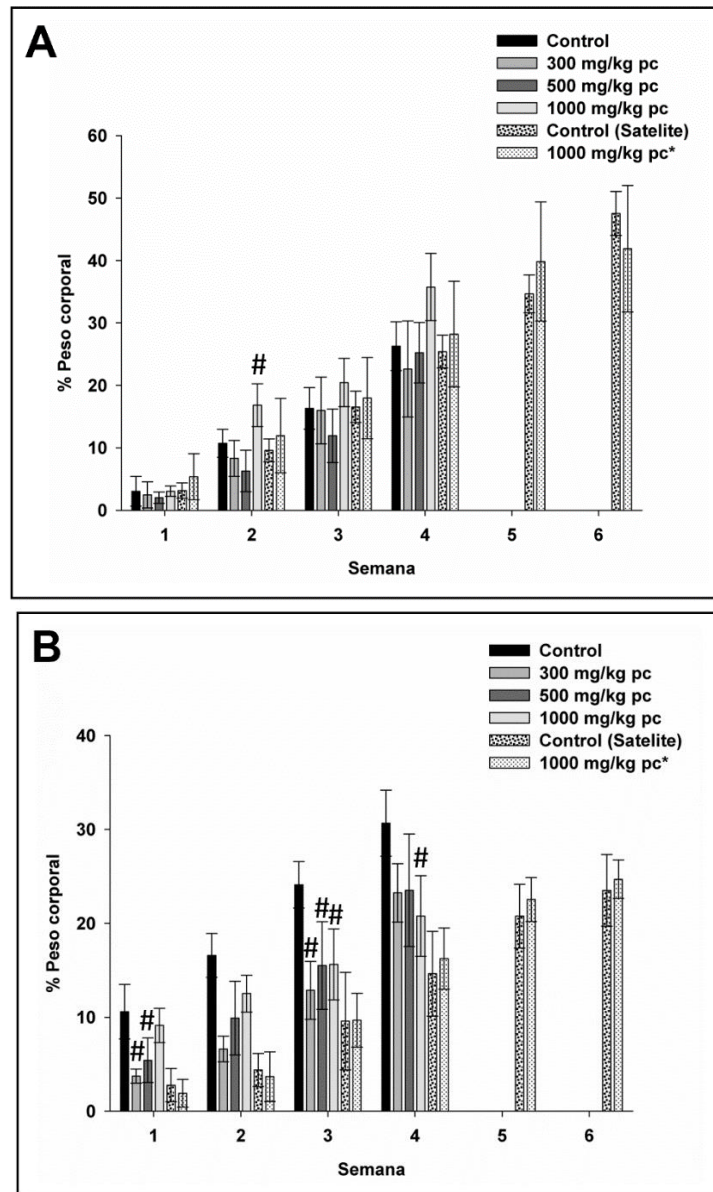


Figura 25. Porcentaje de peso corporal de **A**) Machos y **B**) Hembras. *El grupo satélite para observar la reversibilidad y los grupos de control. Los valores se expresan como la media \pm DE ($n=5$). #Diferencias significativas determinadas con respecto al grupo de control ($p < 0,05$). Las diferencias se determinaron mediante ANOVA de una vía con la prueba de Tukey.

Los parámetros de química sanguínea no mostraron diferencia significativa entre los grupos de tratamiento, control y satélite para ambos sexos. Los valores de bilirrubina, albúmina, globulina y fosfatasa alcalina (AF) permitieron evaluar la función del hígado, mientras que la creatinina y urea la función normal del riñón (Busto y Herrero, 2015). Asimismo, la AST (Aspartato Aminotransferasa) y ALT (Alanina aminotransferasa) descartaron lesiones en diversos órganos y tejidos como el hígado, el riñón, el páncreas, el cerebro o los músculos esquelético y cardíaco (Busto y Herrero, 2015; Galvin y col., 2015). Con base en lo anterior, es posible descartar cualquier tipo de daño renal y hepático producido por la administración repetida del SAME-Cr. Adicionalmente, el perfil lipídico de los grupos de tratamiento y control mostró valores de colesterol total $< 57 \pm 8.5$ y 54.5 ± 4.9 , HDL $< 18 \pm 2.8$ y 19.5 ± 6.3 , LDL $< 21 \pm 4.4$, VLDL $< 21 \pm 4.2$ y 17.9 ± 12.4 y triglicéridos $< 120.5 \pm 105$ y 146.5 ± 41.7 mg/dL en machos y hembras, respectivamente (Tablas 5A y 6A, ANEXO). Estas cantidades son inferiores a los valores de referencia normales (colesterol para machos $< 166.99 \pm 7.13$ y para hembras $< 159.06 \pm 7.6$ y triglicéridos $< 119.33 \pm 4.69$ para machos y 127.33 ± 7.39 mg/dL para hembras) (Mahdi y col., 2020; Ihedioha y col., 2013), lo que permite descartar posibles trastornos en la función cardíaca de los animales tratados con el SAME-Cr (Tablas 15 y 16).

7.10.2.2 Análisis de los órganos principales

En la necropsia de los animales, no se observaron cambios macroscópicos en los órganos principales. En cuanto al peso absoluto y relativo de los órganos, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados y el control para ninguno de los sexos.

Tabla 15. Parámetros de química sanguínea del estudio de toxicidad subaguda en las ratas macho.

Tratamiento	Albumina (g/dL)	AF (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Urea	Creatinina (mg/dL)	Globulina (g/dL)
Control	2.85 ± 0.03	403.2 ± 96.52	48.24 ± 3.99	143.02 ± 27.7	34.4 ± 2.07	0.3 ± 0	3.01 ± 0.27
300 mg/kg pc	2.97 ± 0.1	366.6 ± 55.19	52.48 ± 8.21	132.8 ± 26.45	36 ± 3.16	0.3 ± 0	2.89 ± 0.13
500 mg/kg pc	2.97 ± 0.12	382 ± 47.32	57.14 ± 7.57	162.54 ± 50.61	37 ± 2.73	0.3 ± 0	2.78 ± 0.15
1000 mg/kg pc	2.74 ± 0.34	362.2 ± 46.07	58.08 ± 7.65	232.34 ± 102.3	34.4 ± 2.51	0.26 ± 0.055	2.98 ± 0.26
Control (satélite)	3.08 ± 0.12	407.8 ± 60.73	69.7 ± 17.24	260.32 ± 109.11	44.4 ± 3.29	0.4 ± 0	5.09 ± 0.28
1000 mg/kg pc (satélite)	3.04 ± 0.14	441.8 ± 82.79	68.68 ± 12.21	162.2 ± 32.91	38 ± 5.09	0.42 ± 0.04	5.08 ± 0.15

Tabla 16. Parámetros de química sanguínea del estudio de toxicidad subaguda en las ratas hembra.

Tratamiento	Albumina (g/dL)	AF (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Urea	Creatinina (mg/dL)	Globulina (g/dL)
Control	3.06 ± 0.11	273 ± 37.65	50.18 ± 12.35	121.53 ± 19.72	30 ± 4.3	0.26 ± 0.05	2.96 ± 0.34
300 mg/kg pc	3.09 ± 0.15	306.8 ± 91.55	47.9 ± 6.55	122.04 ± 12.8	34.8 ± 5.31	0.36 ± 0.05	2.97 ± 0.16
500 mg/kg pc	3.14 ± 0.06	269.2 ± 28.02	44 ± 5.21	125.8 ± 24.61	39.4 ± 4.3	0.42 ± 0.04	2.77 ± 0.41
1000 mg/kg pc	3.25 ± 0.11	258 ± 52.22	57.04 ±14.92	123.12 ± 55.48	37.4 ± 4.88	0.26 ± 0.05	3.16 ± 0.11
Control (satélite)	3.41 ± 0.27	327.2 ± 63.2	67.22 ± 28.84	121.53 ± 22.03	45.6 ± 6.5	0.52 ± 0.08	5.42 ± 0.48
1000 mg/kg pc (satélite)	3.31 ± 0.10	269.8 ± 64.26	49.98 ± 6.45	114.36 ± 14.83	41.6 ± 2.88	0.44 ± 0.05	5.36 ± 0.09

Los análisis de la tinción por hematoxilina y eosina mostraron características histológicas normales en todos los órganos de los animales tratados con todas las dosis, en comparación con los animales control. Los riñones y túbulos renales se observaron sin dilatación ni factores inflamatorios, mientras que los corpúsculos renales no presentaron anomalías morfológicas. El área y diámetro de los glomérulos no mostraron diferencias significativas en todos los grupos (Figura 26 A y B). En el hígado, todos los hepatocitos se visualizaban bien definidos y presentaban un núcleo visible, mientras que la mayoría presentaba uno y dos núcleos. En la Figura 26 C y D, no se observa diferencia estadística entre los tratados y el grupo control en el área de los hepatocitos y de las gotas lipídicas, las cuales descartan la presencia de hígado graso.

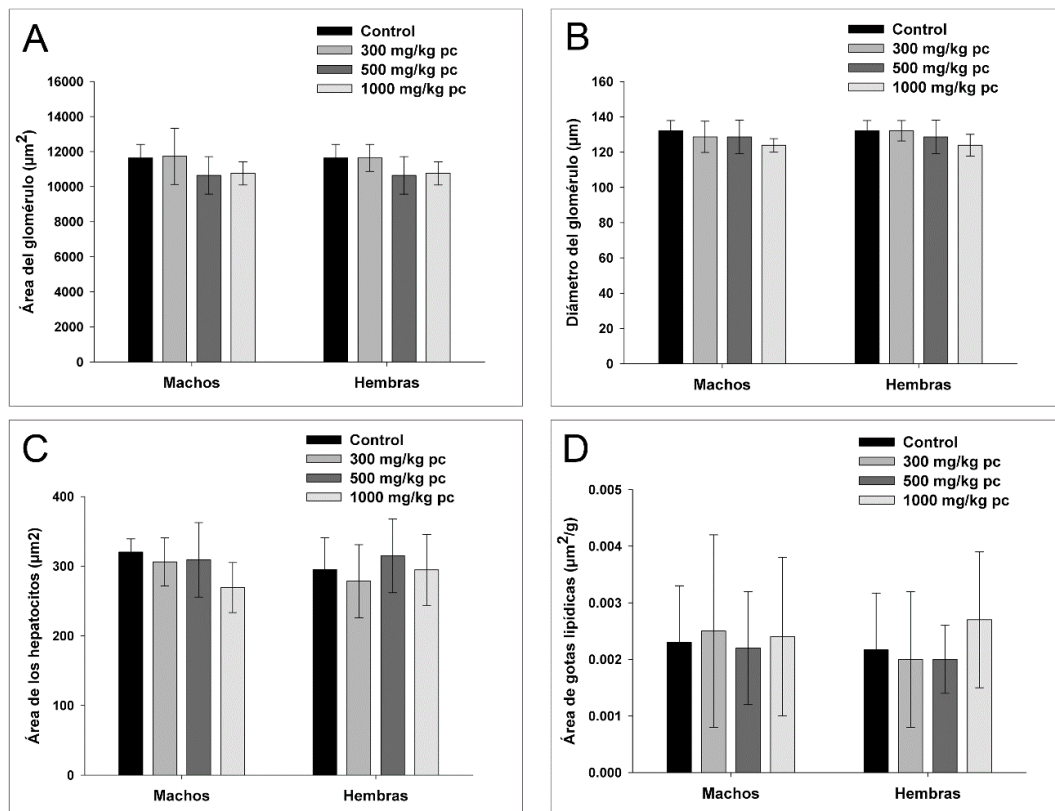


Figura 26. Gráficas de los resultados del diámetro de los glomérulos (A), áreas del glomérulo (B), hepatocito (C) y de las gotas lipídicas (D). Los valores se expresan como la media \pm DE ($n=6$).

En el bazo, no se observó disminución del número de folículos, ni necrosis y la pulpa roja y blanca no presentó anomalías (Figura 27). La histología cerebral no reveló degeneración. Se observa neuronas piramidales y células gliales en cantidad suficiente y con una distribución normal. En los pulmones, se identificó la presencia de alvéolos y conductos alveolares, así como bronquios y bronquiolos bien definidos.

Finalmente, las imágenes histológicas del corazón son normales, mostrando fibras musculares cardíacas y cardiomiocitos con núcleos de posición central (Figura 28). Los resultados obtenidos indican que la dosis única (300 y 2000 mg/kg pc) y repetida del SAME-Cr (300, 500 y 1000 mg/kg pc) no causó alteraciones en los parámetros hematológicos, ni en la morfología de los órganos vitales. Este estudio proporciona datos valiosos sobre la seguridad de SAME-Cr, los cuales permitieron continuar con los estudios preclínicos del efecto antihipertensivo.

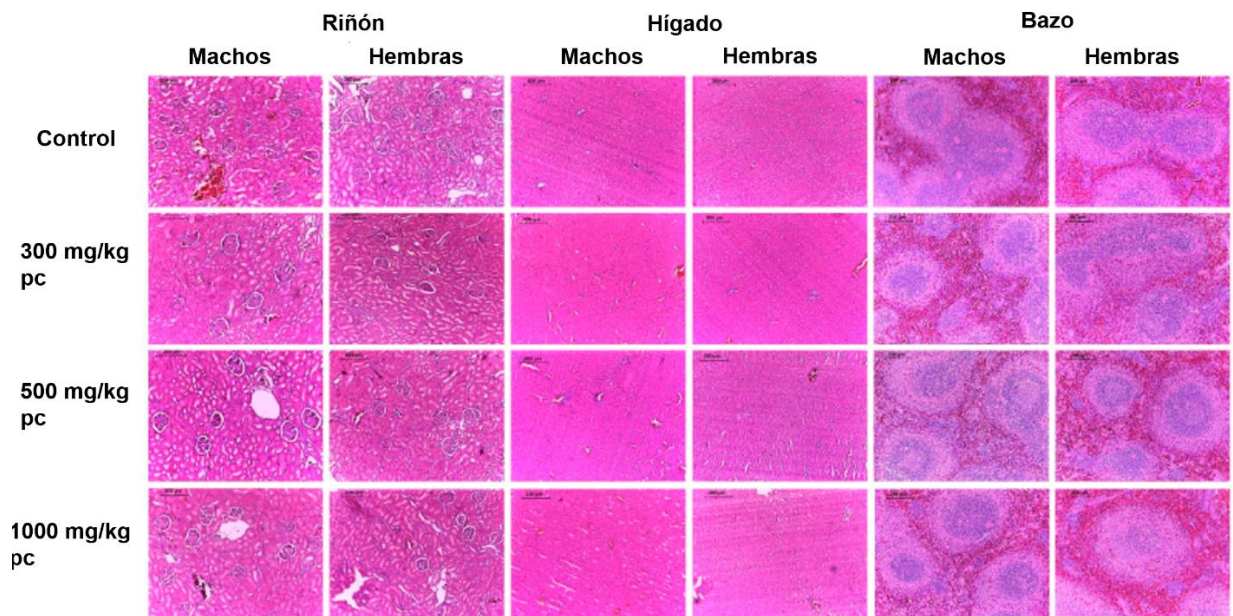


Figura 27. Imágenes representativas de la histología del riñón, hígado y bazo.

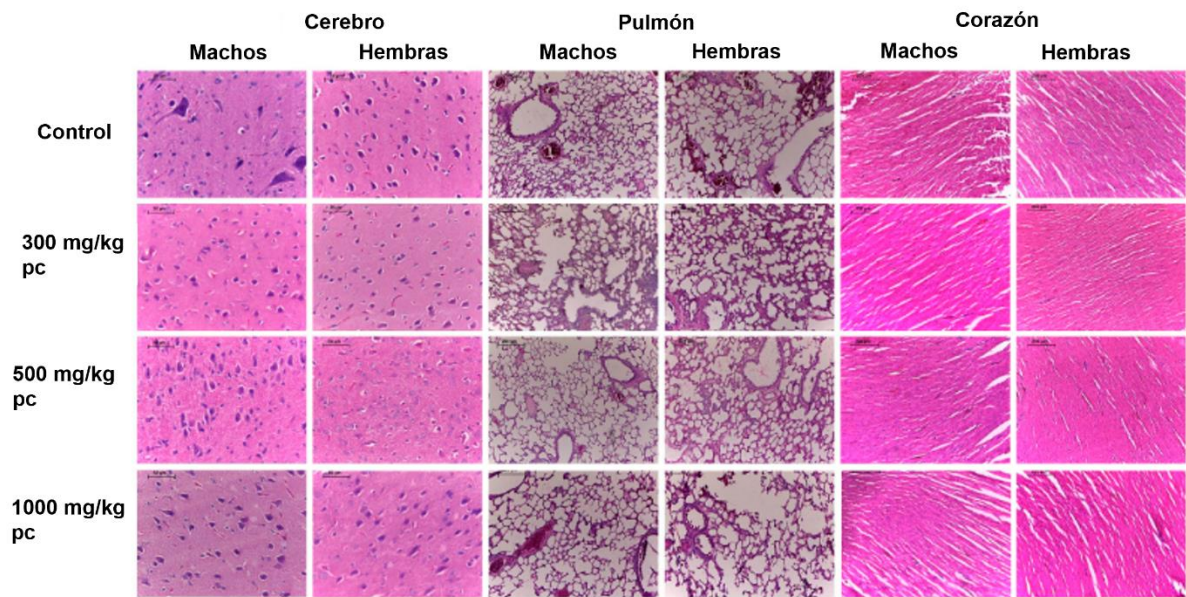


Figura 28. Imágenes representativas de la histología del cerebro, pulmón y corazón.

7.11 Efecto antihipertensivo del extracto metanólico y del SAME-Cr

La administración de L-NAME (zona azul clara de la Figura 29) durante dos semanas indujo un aumento gradual de la presión arterial sistólica y diastólica en las ratas. La presión registrada en estos grupos mostró diferencia significativa en comparación con el normotenso. Así mismo, a partir de la tercera semana, la presión arterial alta (PA) en las ratas hipertensas se mantuvo constante ($196.1 \pm 4.1/152.8 \pm 9.7$ mm Hg), mientras que en los grupos con tratamiento con L-NAME + EMCr o SAME-Cr, se observó una disminución progresiva de la PA hasta finalizar el estudio (zona rosa).

Por otro lado, en la semana cinco, se observó una disminución considerable de la PA en los grupos que recibieron la concentración más alta del EMCr y del SAME-Cr, en los cuales no se observó diferencia significativa en comparación con el grupo normotenso. Asimismo, en la última semana de tratamiento, también se registró una disminución en la PA de los grupos de captopril, 5, 50 y 500 mg/kg del SAME-Cr y 500 mg/kg pc del EMCr con valores registrados de presión sistólica/diastólica de $120.9 \pm 1.4/92.9 \pm 2.7$, $122.6 \pm 4.6/90.9 \pm 6.4$, $119.0 \pm 1.7/88.0 \pm 3.6$, $111.4 \pm$

3.2/86.8 ± 2.1 y 115.7 ± 1/89.4 ± 2.0, respectivamente. Las pruebas estadísticas mostraron diferencia significativa entre estos grupos y el hipertenso y no mostraron una diferencia significativa de la presión arterial sistólica y diastólica con el grupo normotenso (Figura 29 y Tablas 17 y 18).

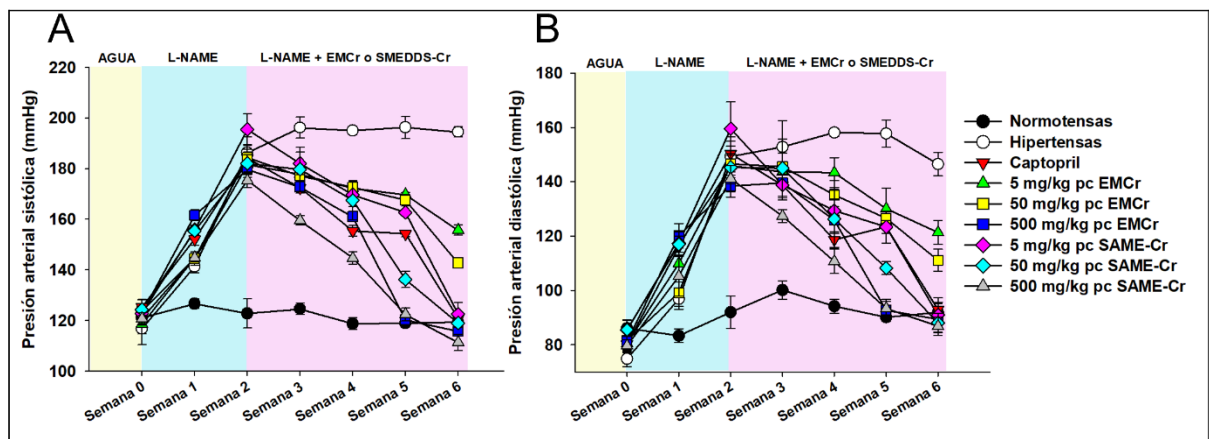


Figura 29. Resultados de la medición de la presión arterial sistólica y diastólica. Los valores obtenidos se expresan como la media ± DE ($n=6$). Zona amarilla: inicio del experimento, zona azul clara: administración con L-NAME durante 2 semanas (inducción a la hipertensión arterial), zona rosa: administración durante 4 semanas del L-NAME con los diferentes tratamientos.

Cabe mencionar que estos resultados describen por primera vez el efecto antihipertensivo del extracto metanólico de las hojas de *C. rosei*. Dicho efecto se debe atribuye evidentemente a los compuestos presentes en el extracto, los cuales, como se mencionó anteriormente, poseen efecto vasodilatador en anillos aórticos de rata. Adicionalmente, se pudo observar que el SAME-Cr mejoró la eficacia del extracto, lo cual podría asociarse con la mejor solubilidad del extracto. En este sentido, los estudios demuestran que los sistemas basados en lípidos aumentan la solubilidad de los fármacos pocos solubles en agua, lo que resulta en un aumento de la biodisponibilidad de esos. Además, estos sistemas pueden servir como vehículos para la administración oral, al encapsular el fármaco. Las ventajas de estos sistemas consisten en reducir la toxicidad, aumentar la vida media y la

biodisponibilidad, además, ayudan a prolongar la eficacia terapéutica debido a la liberación controlada del fármaco y protegen de la digestión enzimática y la degradación de fluidos durante la exposición biológica (Kumar y col., 2023). Con respecto a la composición química del extracto, se ha demostrado que algunos compuestos presentes en el extracto como los ácidos triterpénicos y flavonoides poseen una baja solubilidad en agua (Silva y col., 2020), lo cual resulta en una baja biodisponibilidad. Un estudio realizado por Chen y col. (2018) demostró que de la administración oral de 19.69 mg/kg de AU y 284.3 mg/kg de AO en ratas se obtuvo una concentración plasmática máxima de 487.47 ± 138.94 ng/mL de AU y de 15.128 ng/mL de AO.

Tabla 17. Resultados de la medición de la presión arterial sistólica.

Grupos	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
Normotenso	121.2 ± 3.4	126.7 ± 1.9	122.8 ± 5.7	124.6 ± 2.2	118.8 ± 2.3	118.9 ± 0.9	119.38 ± 1.9
L-NAME	116.8 ± 3.1	141.3 ± 2.6	186.4 ± 6.2	196.1 ± 4.1	194.9 ± 1.7	196.2 ± 4.3	194.5 ± 2.1
Captopril	125.4 ± 3.1	152.1 ± 2.5	184.2 ± 4.8	172.4 ± 2.0	155.5 ± 2.1	154.3 ± 1.3	120.9 ± 1.4
5 mg/kg pc EMCr	118.6 ± 3.9	144.8 ± 2.4	181.5 ± 4.9	177.85 ± 2.3	172.2 ± 2.5	169.8 ± 0.8	155.68 ± 1.9
50 mg/kg pc EMCr	123.6 ± 1.9	144.5 ± 2.7	184.3 ± 3.2	177.1 ± 1.9	172.7 ± 0.9	167.5 ± 2.2	142.7 ± 0.9
500 mg/kg pc EMCr	123.2 ± 4.9	161.6 ± 2.1	179.6 ± 2.1	172.8 ± 1.4	161.0 ± 0.7	120.4 ± 1.9	115.7 ± 1
5 mg/kg pc SAME-Cr	122.8 ± 3.9	155.9 ± 1.7	195.5 ± 6.1	182.4 ± 4.5	169.8 ± 4.9	162.7 ± 0.3	122.6 ± 4.6
50 mg/kg pc SAME-Cr	124.3 ± 2.3	155.5 ± 1.7	182.1 ± 3.4	179.7 ± 8.7	167.5 ± 7.7	136.3 ± 3.21	119.0 ± 1.7
500 mg/kg pc SAME-Cr	120.9 ± 2.2	144.8 ± 1.8	175.4 ± 2.9	159.5 ± 1.9	144.7 ± 2.5	122.4 ± 2.6	111.4 ± 3.2

Tabla 18. Resultados de la medición de la presión arterial diastólica.

Grupos	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
Normotensas	86.1 ± 2.9	83.3 ± 2.6	92.0 ± 5.9	100.2 ± 3.4	94.2 ± 2.6	90.1 ± 1.6	91.9 ± 3.2
L-NAME	74.9 ± 2.9	96.9 ± 3.9	149.3 ± 5.7	152.8 ± 9.7	158.2 ± 1.4	157.8 ± 4.9	146.6 ± 3.4
Captopril	80.2 ± 2.1	116.0 ± 3.7	150.3 ± 6.2	138.7 ± 5.3	118.7 ± 2.9	123.4 ± 5.9	92.9 ± 2.7
5 mg/kg pc EMCr	80.5 ± 1.9	109.9 ± 6.9	145.9 ± 4.5	143.7 ± 3.7	143.4 ± 5.5	130.1 ± 7.6	121.4 ± 4.4
50 mg/kg pc EMCr	81.6 ± 4.5	99.2 ± 5.1	146.6 ± 6.6	145.5 ± 5.1	135.1 ± 5.3	126.6 ± 2.5	111.1 ± 4.0
500 mg/kg pc EMCr	81.2 ± 4.1	120.2 ± 4.5	138.4 ± 4.1	139.6 ± 0.9	125.9 ± 4.9	92.7 ± 3.2	89.4 ± 2.0
5 mg/kg pc SAME-Cr	85.5 ± 3.7	117.4 ± 4.3	159.5 ± 9.8	138.8 ± 4.2	129.4 ± 4.3	123.4 ± 2.4	90.9 ± 6.4
50 mg/kg pc SAME-Cr	85.5 ± 1.1	116.9 ± 2.9	145.3 ± 6.1	144.9 ± 10.8	126.3 ± 10.9	108.2 ± 2.4	88.0 ± 3.6
500 mg/kg pc SAME-Cr	79.6 ± 2.2	105.3 ± 7.3	141.1 ± 4.9	127.4 ± 2.4	110.7 ± 4.5	93.4 ± 3.3	86.8 ± 2.1

También, se ha reportado que la biodisponibilidad del ácido corosólico es del 0.93 %. De la administración de 25.8 mg/kg del AE en ratas, se obtuvo una concentración plasmática máxima de 0.15 µg/mL, lo cual demuestra una absorción deficiente de estos ácidos tras su administración oral (Li y col., 2014). Sin embargo, otros estudios demuestran que los nuevos sistemas de administración de fármacos mejoran la actividad biológica, al aumentar la biodisponibilidad de los ácidos triterpénicos. Por ejemplo, el desarrollo de una nanoemulsión del ácido ursólico y oleanólico mejoró la capacidad antioxidante y la actividad citotóxica de los compuestos (Alvarado y col., 2018). Por otro lado, la biodisponibilidad del AU aumentó 2.68 veces en forma de nanopartículas (Qiu y col., 2019) y un SAME aumentó la biodisponibilidad del AU y AO 4.12 y 5.07 veces, respectivamente (Golla y Veeresham, 2022; Yang y col., 2013). Por último, un estudio demostró que la nanoemulsión del ácido corosólico produjo una liberación acumulada del 86.48 % (Li y col., 2024). Estos estudios comprueban que los nuevos sistemas de administración de fármacos ayudan a mejorar la biodisponibilidad de estos compuestos, lo cual respalda nuestros resultados obtenidos.

7.12 Resultados de la reactividad vascular

Los anillos aórticos de rata previamente precontraídos con fenilefrina mostraron un efecto vasodilatador dependiente a la concentración del carbacol, observando el mayor efecto en las ratas normotensas ($E_{max} = 85.1 \pm 7.9 \%$) y el menor efecto en las ratas hipertensas ($E_{max} = 12.2 \pm 0.02 \%$). Por otro lado, la administración de los tratamientos con EMCr y SAME-Cr mostró un mayor efecto con respecto al grupo hipertenso. El mayor efecto observado en los tratamientos fue en las concentraciones de 500 mg/kg pc con una $E_{max} = 40.8 \pm 3.8$ y $41.2 \pm 1.8 \%$, respectivamente. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre estos grupos con relación al grupo normotenso (Figura 30 y Tabla 19).

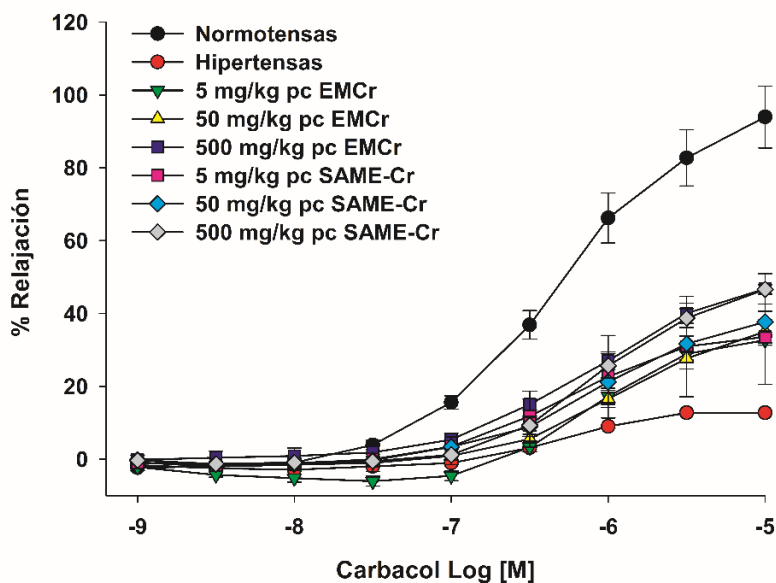


Figura 30. Curva concentración-respuesta del carbacol en los diferentes tratamientos.

El L-NAME es un inhibidor competitivo de la óxido nítrico sintasa, el cual se une al sitio de unión catalítico de la eNOS y disminuye la producción de NO. Diversos estudios han demostrado que la administración prolongada de este inhibidor induce hipertensión arterial (Dawson y Dawson, 1996; Sung y col., 2013). Además, genera disfunción endotelial vascular, lo que conlleva a problemas cardiovasculares (Küng y col., 1995; Nagano y col., 2013). Esto se debe a la disminución de la

vasodilatación, a un aumento de la contracción en los vasos sanguíneos, a la activación de la producción de prostaglandinas, del sistema renina-angiotensina-aldosterona y de las especies reactivas de oxígeno (Pechanova y col., 2020). Por otro lado, el carbacol es un agonista colinérgico que se une a los receptores muscarínicos (M3) presentes en las células endoteliales vasculares (Attinà y col., 2008). La disfunción endotelial generada por la administración crónica de L-NAME conduce a la disminución del efecto vasodilatador inducido por el carbacol.

En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la administración crónica de L-NAME ocasionó una disfunción endotelial en los anillos aórticos, al atenuar significativamente el efecto vasodilatador del carbacol. Asimismo, la administración de los diferentes tratamientos (con el EMCr y el SAME-Cr) lograron revertir de manera parcial el daño ocasionado por la administración crónica del L-NAME.

Tabla 19. E_{max} de los diferentes tratamientos en los experimentos de determinación del efecto antihipertensivo.

Grupo	Normotensas	Hipertensas						
Tratamiento	Agua	L-NAME	EMCr			SAME-Cr		
[Dosis] (mg/kg pc)	<i>ad libitum</i>	30	5	50	500	5	50	500
E_{max} (%)	85.1 ± 7.9	12.2 ± 0.02	29.4 ± 1.0	29.6 ± 2.8	40.8 ± 3.8	30.0 ± 13.6	32.9 ± 2.5	41.2 ± 1.8

8. CONCLUSIONES

Los estudios químicos demostraron que los ácidos triterpénicos son los compuestos mayoritarios de las hojas de *C. rosei*, de los cuales el AU y AE se eligieron como marcadores químicos y farmacológicos por su abundancia y efecto farmacológico ya comprobado. Así mismo, el método desarrollado y validado para la identificación y cuantificación de estos dos ácidos es confiable para evaluar el control de calidad de posibles fitomedicamentos que se desarrollen a partir de esta especie vegetal. Por otro lado, la formulación M17 con 50 % de Transcutol® HP, 35 % de Labrasol® ALF y 15 % de Tween® 60 mostró valores de tamaño de gota, índice de refracción, pH y el potencial Z dentro de los rangos aceptables para la formación de los SAME-Cr. Adicionalmente, el almacenamiento de la formulación M17 a 40°C y 75 % de humedad relativa por 6 meses no mostró cambios significativos en la viscosidad, tamaño de gota, IR y potencial Z lo que demuestra estabilidad del SAME-Cr. Cabe destacar que el SAME administrado por vía oral de manera aguda y subaguda en ratas Sprague Dawley no indujo alteraciones en los análisis hematológicos, bioquímicos e histológicos. En este sentido, considerando la DL₅₀ obtenida, estos datos permiten establecer que el SAME-Cr posee un amplio margen de seguridad y no causa alteraciones en el estado de salud general en animales de experimentación. Adicionalmente, se reportó por primera vez el efecto antihipertensivo del EMCr y su SAME-Cr, en el cual se observó un cambio significativo en la reducción de la presión arterial sistólica y diastólica en la tercera semana de tratamiento en la dosis más alta (500 mg/kg pc), mientras que las dosis más bajas del SAME-Cr (5 y 50 mg/kg pc) sólo presentaron efecto significativo en la cuarta semana de tratamiento. En este sentido, considerando el amplio margen de seguridad del EMCr y su efecto antihipertensivo demostrado, este extracto es un candidato para continuar con los ensayos preclínicos y clínicos para el desarrollo de un fitomedicamento a base de este extracto.

9. SUGERENCIAS

- Estudiar la estabilidad a largo plazo de las cápsulas de gelatina dura que contiene SAME-Cr.
- Aislar e identificar los ácidos triterpénicos minoritarios.
- Optimizar la extracción y la purificación de los ácidos triterpénicos.
- Estudiar la liberación de los AE y AU presentes en el SAME-Cr.
- Llevar a cabo estudios histológicos de los órganos de las ratas con hipertensión tratada.
- Estudiar la biodisponibilidad de los marcadores del SAME-Cr.
- Investigar la toxicidad aguda del ácido euscáfico.
- Investigar la toxicidad crónica del SAME-Cr.
- Llevar a cabo un estudio de genotoxicidad y mutagenicidad del SAME-Cr.

10. REFERENCIAS

- Abuashwashi M, Palomino O, Gómez-Serranillos M. (2016). Geographic origin influences the phenolic composition and antioxidant potential of wild *Crataegus monogyna* from Spain. *Pharmaceutical Biology*. 54(11), 2708–2713.
- Al-Habib O, Mahmud S, Vidari G. (2015). Anti-Contraction Effects of Euscaphic Acid Isolated from *Crataegus azarolus* var. *aronia* L on Rat's Aortic Smooth Muscle. *Advances in Life Science and Technology*. 33.
- Alirezalu A, Ahmadi N, Salehi P, Sonboli A, Alirezalu K, Khaneghah AM, Lorenzo J. (2020). Physicochemical characterization, antioxidant activity, and phenolic compounds of hawthorn (*Crataegus spp.*) fruits species for potential use in food applications. *Foods*. 9(4), 436.
- Alp H, Soner B, Baysal T, Şahin AS. (2016). Protective effects of hawthorn (*Crataegus oxyacantha*) extract against digoxin-induced arrhythmias in rats. *The Anatolian Journal of Cardiology*. 15(12), 970–975.
- Alvarado AC, Calpena ML, Garduño-Ramírez RO, Consolación Melguizo JC, Prados B. (2018). Nanoemulsion Strategy for Ursolic and Oleanic Acids Isolates from *Plumeria Obtusa* Improves Antioxidant and Cytotoxic Activity in Melanoma Cells. 18(6), 847 - 853. DOI: 10.2174/1871520618666180111151846.
- Ameen AAM, Al-Habib OA. (2021). Vasorelaxant Effect of Vitexin, Procyanidin B2 and Isoquercetine on Rat's Aortic Smooth Muscle. *Technium BioChemMed*. 2(4), 17–28. Retrieved from <https://techniumscience.com/index.php/biochemmed/article/view/4805>.
- Ameen AAM. (2023). Uterodilation effect of unripe fruit extract of *Crataegus azarolus* var. *aronia* L. on rat uterine smooth muscles. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 169:106783. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2023.106783.
- Anselm E, Socorro VFM, Dal-Ros S, Schott C, Bronner C, Schini-Kerth V. (2009). *Crataegus* special extract WS 1442 causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive src- and AKT-dependent activation of endothelial NO synthase but not via activation of estrogen receptors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 53(3), 253-260.

- Arques S. (2018). Serum albumin and cardiovascular diseases: A comprehensive review of the literature. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. 67(2), 82-90.
- Arya A, Khandelwal K, Singh A, Ahmad H, Agrawal S, Khatik R, Dwivedi AK. (2015). Validation of RP-HPLC method for simultaneous quantification of bicalutamide and hesperetin in polycaprolactone-bicalutamide-hesperetin-chitosan nanoparticles. *Journal of Chromatographic Science*. 53(9), 1485–1490.
- Attinà TM, Oliver JJ, Malatino LS, Webb DJ. (2008). Contribution of the M3 muscarinic receptors to the vasodilator response to acetylcholine in the human forearm vascular bed. *British Journal of Clinical Pharmacology: List of Issues*. 66(2), 300-303. doi:10.1111/j.1365-2125.2008.03194.x.
- Bahadır-Acıkara Ö, Özbilgin S, Saltan-İşcan G, Dall'Acqua S, Rjašková V, Özgökçe F, Šmejkal K. (2018). Phytochemical analysis of *Podospermum* and *Scorzonera* n-hexane extracts and the HPLC quantitation of triterpenes. *Molecules*. 23(7), 1813.
- Bragulat E, Antonio M. (2001). Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial: fármacos antihipertensivos. *Medicina Integral*. 37(5), 215-221.
- Busto V, Herrero C. (2015). Pruebas de función hepática: B, AST, ALT, FA y GGT. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 107 (10), 648.
- Cabrera E. (2008). La adventicia: estado actual del conocimiento. *Revista Argentina de Cardiología*. 76(1), 58-63.
- Cabrera-Fischer E, Zócalo Y, Lascano E, Negroni J, Wray S, Bia D. (2015). La adventicia arterial: actor olvidado del sistema cardiovascular. *Revista Uruguay de Cardiología*. 30(1), 58-65.
- Carvalho JC, Fernandes C, Rodriguez-Amado J, Navarrete A, Quintans-Júnior L. (2018). Ethnopharmacological studies for the development of new drugs. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 7593296.
- Chen XX, Zhu P, Liu B, Wei L, Xu Y. (2018). Determinación simultánea de catorce compuestos del extracto de *Hedyotis diffusa* Willd en ratas mediante el método UHPLC-MS/MS: Aplicación al estudio de la farmacocinética y la distribución

- tisular. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 159, 490–512. doi:10.1016/j.jpba.2018.07.023.
- Chudzik M, Korzonek-Szlacheta I, Król W. (2015). Triterpenes as potentially cytotoxic compounds. *Molecules*. 20(1), 1610–1625.
- Cilek A, Celebi N, Tirnaksiz F. (2006). Lecithin-based microemulsion of a peptide for oral administration: preparation, characterization, and physical stability of the formulation. *Drug Delivery*. 13(1),19–24.
- Civantos-Calzada B, Aleixandre De Artinano A. (2001). Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacological Research*. 44(3).
- Claro-Cala CM, Quintela JC, Pérez-Montero M, Miñano J, de Sotomayor MA, Herrera MD, Rodríguez-Rodríguez AR (2020). El aceite de orujo de oliva concentrado en Ácidos triterpénicos restaura la función vascular, la tolerancia a la glucosa y la progresión de la obesidad en ratones. *Nutrientes*. 12(2), 323.
- Cloud A, Vilcins D, McEwen B. The effect of hawthorn (*Crataegus* spp.) on blood pressure: A systematic review. *Advances in Integrative Medicine*, 7(3),167-175.
- CNQFB. (2002). “Guía de Validación de Métodos Analíticos” Editorial Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México S.A. de C.V. Ciudad de México.
- CSG (2023). Guía de Evaluación de Insumos para la Salud. Consejo de Salubridad General. Dirección General de Valoración Científica y Técnica. Comisión del Compendio Nacional de Insumos para la Salud. México. 79 pág. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/920131/GEI_Enero_2023.pdf.
- Cui M, Cheng L, Zhou, Z, Zhu Z, Liu Y, Li C, Liao B, Fan M, Duan B. (2024). Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and safety concerns of hawthorn (*Crataegus* genus): A comprehensive review. *Journal of Ethnopharmacology*, 319, Part 2, 117229. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.117229>.
- Daniele C, Mazzanti G, Pittler M, Ernst E. (2006). Adverse-event profile of *Crataegus* spp. *Drug Safety*. 29(6), 523–535.
- Danielsson I, Lindman B (1981). The definition of microemulsion. *Colloids and Surfaces*. 3:391–2.

- Dawson VL, Dawson TM. (1996). Nitric Oxide Toxicity in Central Nervous System Cultures. *Methods in Neurosciences*. 30, 26-43. [https://doi.org/10.1016/S1043-9471\(96\)80094-2](https://doi.org/10.1016/S1043-9471(96)80094-2).
- Du X, Zhang X, Bu H, Zhang T, Lao Y, Dong W. (2019). Molecular analysis of evolution and origins of cultivated hawthorn (*Crataegus spp.*) and related species in China. *Frontiers Plant Science*. 10, 443.
- Eble J, Niland S. (2009). The extracellular matrix of blood vessels. *Current Pharmaceutical Design*. 15(12), 1385-1400.
- Edwards JE, Brown PN, Talent N, Dickinson TA, Shipley PR. (2012). A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry*. 79,5-26.
- EMA (2025). European Union herbal monograph on *Crataegus monogyna* Jacq. (Lindm.), *C. laevigata* (Poir.) DC. or their hybrids; *C. pentagyna* Waldst. et Kit. ex Willd.; *C. azarolus* L. EMA/HMPC/234781/2024. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Draft-Revision 1. 19 March 2025, 10 pags. https://www.fitoterapia.net/archivos/202504/draft-european-union-herbal-monograph-crataegus-monogyna-jacq-lindm-c-laevigata-poir-dc-or-their-hybrids-c-pentagyna-waldst-et-kit-ex-willd-c-azarolus-l_en.pdf?1 [Fecha de consulta: 07 de junio de 2025].
- EMA. (2006). Validation of Analytical Procedures: Text and methodology. Página electrónica: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf. [Fecha de consulta: 10 de marzo del 2021].
- EMA. (2010). Guideline on declaration of herbal substances and herbal preparations 1 in herbal medicinal products 2 /traditional herbal medicinal products. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-declaration-herbal-substances-herbal-preparations-herbal-medicinal-products/traditional-herbal-medicinal-products-spc_en.pdf. [Fecha de consulta: 10 de septiembre del 2021].
- ENSANUT (2024). Detección, atención y control de hipertensión arterial. Consultado en:

<https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanutcontinua2023/doctos/analiticos/15867-Texto%20del%20art%C3%ADculo-82507-4-10-20240822.pdf>. [consultada el 09 de junio del 2025].

- Félétou M. (2011). *The Endothelium*. San Rafael: Morgan y Claypool Life Sciences.
- FEUM (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos) (2020). 13ª ed., Suplemento para establecimientos dedicados a la fabricación de medicamentos, capítulo: validación de métodos analíticos. Comisión permanente de la farmacopea de los estados unidos mexicanos.
- FEUM 13.0. Capítulo de Métodos generales de análisis. (2021). Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. México, pp. 219-564.
- FHEUM 3.0. (2021). Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud, México. Secretaría de Salud. México, 528 p. Consultado en: <https://www.farmacopea.org.mx/>. [consultada el 27 de febrero del 2022].
- Flanagan J, Singh H. (2006). Microemulsions: A potential delivery system for bioactives in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46(3), 221–237
- Flórez J. (2014). *Farmacología Humana*. 6ª edición. España: Elsevier Masson.
- Fuchs FD and Whelton PK. (2020). High blood pressure and cardiovascular disease. *Hypertension*. 75, 285–292.
- Galleano M, Bernatova I, Puzserova A, Balis P, Sestakova N, Pechanova O, Fraga C. (2013). (-)-Epicatechin reduces blood pressure and improves vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats by NO-mediated mechanism. *IUBMB life*. 65(8), 710-715.
- Galvin Z, McDonough A, Ryan J, Stewart S. (2015). Blood alanine aminotransferase levels > 1,000 IU/l - causes and outcomes. *Clinical Medicine*. 15 (3), 244–247. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.15-3-244>.
- Gao C, Cunningham D, Liu H, Khoo C, Gu L. (2018). Development of a thiolysis HPLC method for the analysis of procyanidins in cranberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 66(9), 2159-2167.

- Garay I, Vega L, Ganado E. (2017). Curso básico sobre hipertensión. Tema 2. Antagonistas de los receptores de la angiotensina II. *Farmacia Profesional*. 31(2), 22-30.
- García-Mateos R, Aguilar-Santelises L, Soto-Hernández M, Nieto-Angel R. (2013). Flavonoids and antioxidant activity of flowers of Mexican *Crataegus spp.* *Natural Product Research*. 27(9), 834-836.
- Golla CM, Veeresham C. (2022). Self-micro emulsifying drug delivery system of ursolic acid: formulation development, characterization, pharmacokinetic and pharmacodynamic studies for diabetic complications. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 14(2), 77-86.
- Hellenbrand N, Sendker J, Lechtenberg M, Petereit F, Hensel A. (2015). Isolation and quantification of oligomeric and polymeric procyanidins in leaves and flowers of hawthorn (*Crataegus spp.*). *Fitoterapia*. 104, 14–22.
- Hernández-Escolar J, Herazo-Beltrán Y, Valero M. (2010). The frequency of cardiovascular disease-associated risk factors in a university student population. *Revista de Salud Pública*. 12(5), 852-864.
- Hernández-Pérez A, Bah M, Ibarra-Alvarado C, Rivero-Cruz J, Rojas-Molina A, Rojas-Molina J, Cabrera-Luna J. (2014). Aortic relaxant activity of *Crataegus gracilior* Phipps and identification of some of its chemical constituents. *Molecules*. 19(12), 20962–20974.
- Holubarsch C, Colucci W, Meinertz T, Gaus W, Tendera M. (2018). The efficacy and safety of *Crataegus* extract WS® 1442 in patients with heart failure: The SPICE trial. *European Journal of Heart Failure*. 10(12), 1255-1263.
- Honary S y Zahir F. (2013). Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 12(2), 255-264.
- ICH, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), in: *Valid. Anal. Proced.*, ICH, Geneva, 2005, pp. 13 [https://www.ich.org/fileadmin/Public Web Site/ICH Products/Guidelines/Quality/Q2 R1/Step4/Q2 R1 Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public%20Web%20Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf).

- Ihedioha J, Noel-Uneke O, Ihedioha T. (2013). Reference values for the serum lipid profile of albino rats (*Rattus norvegicus*) of varied ages and sexes. *Comparative Clinical Pathology*. 22, 93–99. <https://doi.org/10.1007/s00580-011-1372-7>.
- INEGI (2023). Estadísticas de defunciones registradas (EDR). Consultado en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2024/EDR/EDR2023_ene-dic.pdf [consultada el 14 de mayo del 2025].
- INEGI (2025). Estadísticas de defunciones registradas (EDR). Consultado en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2025/edr/EDR_RR_En-sep2024.pdf [consultada el 14 de mayo del 2025].
- Javadzadeh Y, Adibkia K, Hamishekar H. (2015). Transcutol® (Diethylene Glycol Monoethyl Ether): A Potential Penetration Enhancer. In: Dragicevic, N., Maibach, H. (eds) *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-47039-8_12
- Kale NS y Deore LS. (2017). Emulsion micro emulsion and nano emulsion: A review. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 8(1), 39-47.
- Kallassy H, Fayyad-Kazan M, Makki R, EL-Makhour Y, Hamade E, Rammal H, Badran B. (2017). Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative activities of the plant lebanese *Crataegus Azarolus* L. *Medical Science Monitor Basic Research*. 23, 270–284.
- Kaur P, Muthuraman A, Kaur M. (2015). The Implications of Angiotensin-Converting Enzyme and Their Modulators. *ACS Chemical Neuroscience*. 6(4), 508–521.
- Kent K, Charlton K, Lee S, Mond J, Russell J, Mitchell P, Flood V. (2018). Dietary flavonoid intake in older adults: how many days of dietary assessment are required and what is the impact of seasonality? *Nutrition Journal*. 17(7), 1-9.
- Kjeldsen, SE. (2018). Hypertension and cardiovascular risk: General aspects. *Pharmacological Research*, 129, 95–99.
- Koch E, Malek FA. (2011). Standardized Extracts from Hawthorn Leaves and Flowers in the Treatment of Cardiovascular Disorders – Preclinical and Clinical Studies. *Planta Medica*. 77, 1123–1128.

- Kumar AS, Karpathak S, Kumar R, Kumar D, Prasanna DM, Agarwal V. (2023). Lipid based drug delivery systems for oral, transdermal and parenteral delivery: Recent strategies for targeted delivery consistent with different clinical application. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 85,104526. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104526>.
- Küng CF, Moreau P, Takase H, Lüscher TF. (1995). L-NAME hypertension alters endothelial and smooth muscle function in rat aorta. Prevention by trandolapril and verapamil. *Hypertension*. 26(5), 744–751. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.26.5.744>
- Lang D, Holzem K, Kang C, Xiao M, Hwang H, Ewald G, Efimov I. (2015). Arrhythmogenic Remodeling of β_2 versus β_1 Adrenergic Signaling in the Human Failing Heart. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 8(2), 409–419.
- Laurent S. (2017). Antihypertensive drugs. *Pharmacological Research*. 124, 116-125.
- LGS. (2013). Capítulo IV. Medicamentos. Consultado en: http://fitomedicina.org/old/archivos/mexico_ley_de_medicamentos.pdf. [Consultada el 27 de febrero del 2022]
- Li H, Tan X, Qin L. (2024). Preparation, process optimisation, stability and bacteriostatic assessment of composite nanoemulsion containing corosolic acid. *Heliyon*. 10(19):e38283. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e38283.
- Li JJ, Li Y, Bai M, Tan JF, Wang Q, Yang J. (2014). Simultaneous determination of corosolic acid and euscaphic acid in the plasma of normal and diabetic rat after oral administration of extract of *Potentilla discolor* Bunge by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 28(5):717-24. doi: 10.1002/bmc.3098.
- Li Q, Zhao W, Zeng X, Hao Z. (2018). Ursolic acid attenuates atherosclerosis in apoE^{-/-} mice: role of LOX-1 mediated by ROS/NF- κ B pathway. *Molecules*. 23(5), 1101.

- Li S, Han Q, Qiao C. (2008). Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Medicina China*. 3, 7. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-3-7>.
- Loh YC, Tan CS, Chang YS, Yeap ZQ, Ng CH, Yam MF. (2018). Overview of the microenvironment of vasculature in vascular tone regulation. *International journal of molecular sciences*. 19(1), 120. <https://doi.org/10.3390/ijms19010120>
- Londoño-Ruiz PS, Serafini MR, Alves I A, Novoa D. M. A. (2022). Recent Progress in Self-Emulsifying Drug Delivery Systems: A Systematic Patent Review (2011-2020). *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 39(2), 1–77.
- López-Fitz D. (2019). Evaluación de la actividad vasorrelajante de los extractos metanólicos obtenidos a partir de las hojas de *Crataegus rosei* y caracterización química de algunos de sus metabolitos secundarios. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
- López-Fitz D. (2023). Los tejocotes en la medicina tradicional y su potencial terapéutico. *Ciencia*. 74 (4): 40-43.
- López-Sendó J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni A, Dargie H, Torp-Pedersen C. (2004). Expert consensus document on β -adrenergic receptor blockers: The Task Force on Beta-Blockers of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*. 25, 1341–1362.
- Luna-Vázquez F, Ibarra-Alvarado C, Rojas-Molina A, Rojas-Molina J, Yahia E, Rivera-Pastrana D, Zavala-Sánchez M. (2013). Nutraceutical value of black cherry *Prunus serotina* Ehrh. Fruits: antioxidant and antihypertensive properties. *Molecules*. 12(18), 14597–14612.
- Lund J, Brown P, Shipley P. (2020). Quantification of north American and European *Crataegus* flavonoids by nuclear magnetic resonance spectrometry. *Fitoterapia*. 143.
- Mahdi C, Citrawati P, Hendrawan V. (2020). The effect of rice bran on triglyceride model. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 833, 012022. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/833/1/012022>.

- Makdessi SA, Sweidan H, Dietz K, Jacob R. (1999). Protective effect of *Crataegus oxyacantha* against reperfusion arrhythmias after global no-flow ischemia in the rat heart. *Basic Research in Cardiology*. 94(2), 71 – 77.
- Mohsin K. (2012). Design of lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drug fenofibrate: effects of digestion. *AAPS PharmSciTech*. 13(2),637-46.
- Moore KL. (2013). *Anatomía con orientación clínica* (Vol. 7° edición). Barcelona, España: Wolters Kluwer.
- Motalib MA, Faysal-Bellah S, Raussel-Rahman SM, Ayedur-Rahman A, Monjur-Murshid GM, Bin-Emran T. (2014). Phytopharmacological evaluation of ethanol extract of *Sida cordifolia* L. roots. *Asian Pacific journal of tropical. Biomedicine*. 4(1), 18–24.
- Müller A, Linke W, Zhao Y, Klaus W. (1996). *Crataegus* extract prolongs action potential duration in guinea-pig papillary muscle. *Phytomedicine*. 3(3), 257-261.
- Nabavi SF, Habtemariam S, Ahmed T, Sureda A, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi SM. (2015). Polyphenolic composition of *Crataegus monogyna* Jacq: from chemistry to medical applications. *Nutrients*. 7(9), 7708–7728.
- Nafiu M, Hamid A, Muritala H, Adeyemi S. (2017). Preparation, standardization, and quality control of medicinal plants in Africa. *Medicinal spices and vegetables from Africa*. Academic Press. 171-204.
- Nagano K, Ishida J, Unno M, Matsukura T, Fukamizu A. (2013). Apelin elevates blood pressure in ICR mice with L-NAME induced endothelial dysfunction. *Molecular Medicine Reports*.7(5):1371-1375. doi:10.3892/mmr.2013.1378
- Nastiti CMRR, Ponto T, Abd E, Grice JE, Heather AE, Benson HAE, Roberts MS. (2017). Topical nano and microemulsions for skin delivery. *Pharmaceutics*. 9(4), 37.
- Newman DJ, Cragg GM. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*. 83(3), 770-803.

- Niederseer D, Ledl-Kurkowski E, Kvitka K, Funk P, Niebauer J. (2019). Safety and effects of *Crataegus* extract WS 1442 and nordic walking on lipid profile and endothelial function: a randomized, partially blinded pilot study in overweight volunteers. *Acta Clinica Croatica*. 58(4), 604–614.
- NOM-072-SSA1-2012. (2012). Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios - 21 de Noviembre de 2012. Consultado en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5278341&fecha=21/11/2012 [consultada el 10 de Enero del 2022].
- NOM-072-SSA1-2015. Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios.07 de Junio de 2016. <https://catalogonacional.gob.mx/FichaRegulacionid?regulacionId=167498>.
- Núñez-Colín C, Nieto-Ángel R, Barrientos-Priego A, Segura S, Sahagún-Castellanos J, González-Andrés F. (2008). Distribución y caracterización eco-climática del género *Crataegus* L. (Rosaceae, Subfam. Maloideae) en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 14(2), 177-184.
- Núñez-Colín CA, Hernández-Martínez MÁ. (2011). La problemática en la taxonomía de los recursos genéticos de tejocote (*Crataegus spp.*) en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2(1), 141-153.
- OCDE. (2002) Directriz de la OCDE para ensayos de productos químicos. Toxicidad oral aguda - método de clase de toxicidad aguda, directriz núm. 423.
- OCDE. (2008). Estudio de toxicidad oral a dosis repetidas de 28 días en roedores, directriz núm. 407.
- OIN. Organización Internacional de Normalización (ISO/IEC 17025:2017). (2017). Sistema de gestión para los laboratorios de ensayo y/o calibración.
- Olivas-Aguirre FJ, Wall-Medrano A, González-Aguilar G, López-Díaz JA, Álvarez-Parrilla E, De la Rosa L, Ramos-Jimenez A. (2015). Hydrolyzable tannins; biochemistry, nutritional & analytical aspects and health effects. *Nutrición Hospitalaria*. 55(1), 55-66.

- OMS. (2021). Enfermedades cardiovasculares. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). [consultada el 8 de Septiembre del 2022].
- OMS. (2023). Hipertensión. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension> [consultada el 3 de mayo del 2025].
- OMS. (2024). Las 10 principales causas de defunción. Consultado en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> [consultada el 14 de Mayo del 2025].
- Ornelas-Lim C, Luna-Vázquez FJ, Rojas-Molina A, Ibarra-Alvarado C. (2021). Development of a quantified herbal extract of hawthorn *Crataegus mexicana* leaves with vasodilator effect. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 29(11) 1258-1266. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.10.002>.
- Patist A, Bhagwat SS, Penfield KW. (2000) On the measurement of critical micelle concentrations of pure and technical-grade nonionic surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*. 3: 53–58. <https://doi.org/10.1007/s11743-000-0113-4>.
- Pechanova O, Vrankova S, Cebova M. (2020) Chronic L-Name-Treatment Produces Hypertension by Different Mechanisms in Peripheral Tissues and Brain: Role of Central eNOS. *Pathophysiology*. 27(1):46-54. doi:10.3390/pathophysiology27010007.
- Peraza-Zaldívar JÁ, Aguilera-Mora L, Eduardo-Bazzini D, Salazar-Pier FE, Suasnavar-Portillo P, Ortega-Pantoja W, Miranda-Aquino T. (2019). *Cardiología y Cirugía Cardiovascular*. México: CTO.
- Peters W, Druempel V, Kusche-Vihrog K, Schubert C, Oberleithner H. (2012). Nanomechanics and sodium permeability of endothelial surface layer modulated by hawthorn extract WS 1442. *PLoS One*. 7(1), e29972.
- Piedra E, Albarrán A, Rull J, Piñero D, Sosa V. (2016). Using multiple sources of characters to delimit species in the genus *Crataegus* (Rosaceae): the case of the *Crataegus rosei* complex. *Journal Systematics and Biodiversity*. 14,244-260.

- Qiu L, Zhao X, Zu Y, Zhang Y, Liu Y, Wu W, Li Y. (2019). Ursolic acid nanoparticles for oral delivery prepared by emulsion solvent evaporation method: characterization, in vitro evaluation of radical scavenging activity and bioavailability. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 47(1), 609–620. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1573739>.
- Ramírez-Sánchez I, Aguilar H, Ceballos G, Villarreal F. (2012). (–)-Epicatechin-induced calcium independent eNOS activation: roles of HSP90 and AKT. *Molecular and cellular biochemistry*. 370(1-2), 141–150. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1405-9>
- Ramírez-Sánchez I, Mansour C, Navarrete-Yañez V, Ayala-Hernandez M, Guevara G, Castillo C, Loredó M, Bustamante M, Ceballos G, Villarreal FJ. (2018). (–)-Epicatechin induced reversal of endothelial cell aging and improved vascular function: underlying mechanisms. *Food & function*. 9(9), 4802–4813.
- Rico-Chávez AK. (2016). Caracterización química de una fracción vasorrelajante del extracto metanólico foliar de *Crataegus gracilior* Phipps (Rosaceae). Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Rodríguez-Martínez R. (2021). Determinación de la actividad vasodilatadora e identificación de compuestos fenólicos de la fracción de Taninos del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Rodríguez-Rodríguez R, Perona J, Herrera D, Ruíz-Gutiérrez V. (2006). Triterpenic Compounds from “Orujo” Olive Oil Elicit Vasorelaxation in Aorta from Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 2096–2102.
- Sahin NO. (2007) Niosomes as nanocarrier systems. In: *nanomaterials and nanosystems for biomedical applications*. 67e81.
- Salehi B, Ata A, Anil Kumar N, Sharopov F, Ramírez-Alarcón K, Ruiz-Ortega A. (2019). Antidiabetic potential of medicinal plants and their active components. *Biomolecules*. 9(10), 551.

- Saturno-Chiu G. (2017). *Cardiología*. 1ra. Edición. Editorial El Manual Moderno, México.
- Schlegelmilch R, Heywood R. (1994). Toxicity of Crataegus (hawthorn) extract (WS 1442). *Journal of the American College of toxicology*. 13(2), 103-111.
- Schwarz M, Klier B, Sievers H. (2009). Herbal Reference Standards. *Planta Medica*. 75(7), 689-703.
- Scossa F, Benina M, Alseekh S, Zhang Y, Fernie A. (2018). The integration of metabolomics and next-generation sequencing data to elucidate the pathways of natural product metabolism in medicinal plants. *Planta medica*. 84(12/13), 855-873.
- Sendker J, Petereit F, Lautenschläger M, Hellenbrand N, Hensel A. (2013). Phenylpropanoid-substituted procyanidins and tentatively identified procyanidin glycosides from hawthorn (*Crataegus spp.*). *Planta Medica*. 79, 45–51.
- Seo DY, Lee SR, Heo JW, No MH, Rhee BD, Ko KS, Kwak HB, Han J. (2018). Ursolic acid in health and disease. *The Korean journal of physiology y pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 22(3), 235–248.
- Shambhu D y Amita K. (2015). Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) – challenges and road ahead. *Drug delivery*. 22(6), 675-690.
- Sharma V, Sarkar IN. (2013). Bioinformatics opportunities for identification and study of medicinal plants. *Briefings Bioinformatics*. 14(2), 238–250.
- Shatoor AS. (2011). Acute and sub-acute toxicity of Crataegus Aronia Syn. Azarolus (L.) whole plant aqueous extract in Wistar rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 6 (2), 37–45. <https://doi.org/10.3844/ajptsp.2011.37.45>.
- Shi Y, Kong X, Yin H, Zhang W. (2019). Effect of hawthorn leaf flavonoids in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary syndrome in rats. *Pathobiology*. 86, 102–110.
- Shimokawa H, Godo S. (2016). Diverse Functions of Endothelial NO Synthases System: NO and EDH. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 67(5), 361–366.

- Silva NHCS, Morais ES, Freire CSR, Freire MG, Silvestre AJD. (2020). Extraction of High Value Triterpenic Acids from *Eucalyptus globulus* Biomass Using Hydrophobic Deep Eutectic Solvents. *Molecules*. 25(1), 210. Published 2020 Jan 4. doi:10.3390/molecules25010210
- Soares SS, Bekbolatova E, Cotrim MD, Sakipova Z, Ibragimova L, Kukula-Koch W, Boylan F. (2019). Chemistry and pharmacology of the kazakh *Crataegus almaatensis pojark*: an Asian herbal medicine. *Antioxidants*. 8(8), 300.
- Somin P, Jihee C, Hongjun J, Sang S, Seunghee L, Sanghee K. (2019). Expedient Synthesis of Alphitolic Acid and Its Naturally Occurring 2-O-Ester Derivatives. *Journal Natural Products*. 82, 895–902, <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00986>.
- Stuart FI. (2013). *Fisiología humana* (Vol. Decimotercera edición). D.F, México: McGraw-Hill.
- Sucher N, Carles M. (2008). Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants. *Planta Medica*. 74(6), 603-623.
- Sung, J. H., Jo, Y. S., Kim, S. J., Ryu, J. S., Kim, M. C., Ko, H. J., & Sim, S. S. (2013). Effect of Lutein on L-NAME-Induced Hypertensive Rats. *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 17(4), 339–345. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2013.17.4.339>
- Svedstrom U, Vuorela H, Kostianen R, Tuominen J, Kokkonen J, Rauha J. P, Hiltunen R. (2002). Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers. *Phytochemistry*. 821–825.
- Tagle R. (2018). Diagnóstico de hipertensión arterial. *Revista de Medicina Clínica*. 29(1), 12-20.
- Talegaonkar S, Mustafa G, Akhter S. (2010). Design and Development of Oral Oil-in-Water Nanoemulsion Formulation Bearing Atorvastatin: In Vitro Assessment. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 31(5), 690-701. DOI: 10.1080/01932690903120540

- Taylor AM, Bordoni B. (2021). Histología, Sistema vascular sanguíneo. [Actualizado el 10 de mayo de 2021]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Publicación de StatPearls; 2022 ene-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553217/>.
- Tobyn G, Denham A, Whitelegg M. (2011). The historical sources. The western herbal tradition. Churchill Livingstone. 1-22.
- Torres-Ortiz DA, Eloy RD, Moustapha B, César IA, Edmundo MS, Jesús Eduardo CR, Dulce María RP. (2020). Vasorelaxing effect and possible chemical markers of the flowers of the Mexican *Crataegus gracilior*. Natural product research. 34(24), 3522–3525. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1577833>.
- Turner G. (2007). El Códice de la Cruz-Badiano y su extensa familia herbaria. Revista Historias. INAH. 68, 109-122. <https://mediateca.inah.gob.mx/repositorio/islandora/object/articulo%3A13229>.
- Turner, G. (2007). El Códice de la Cruz-Badiano y su extensa familia herbaria. Revista Historias. INAH. 68, 109-122. <https://mediateca.inah.gob.mx/repositorio/islandora/object/articulo%3A13229>.
- United Nations. (2023). Chapter 3.1: Acute toxicity. In: United Nations (Eds.), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). United Nations, New York and Geneva, pp. 115-126. <https://doi.org/10.18356/9789210019071>.
- United states Pharmacopeia (USP) (2020). 1225 Validacion de procedimientos farmacopeicos. United States Pharmacopia.
- United states Pharmacopeia (USP) (2020). 1225 Validacion de procedimientos farmacopeicos. United States Pharmacopeia Convention. Rockville, USA. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M99945_04_02
- Uttreja P, Indrajeet Y, Narala N, Elkanayati, Repka M. (2025). Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS): Transition from Liquid to Solid—A Comprehensive Review of Formulation, Characterization, Applications, and Future Trends. Pharmaceutics. 17. 63. [10.3390/pharmaceutics17010063](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17010063).

- Velasco-Lezama R, Tapia-Aguilar R, Vega-Avila E. (2004). Obtenido de aspectos históricos para el uso de las plantas medicinales: <http://www2.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n51ne/plantas.pdf>.
- Viada BN, Juárez AN, Pachón Gómez EM, Fernández MA. (2018). Determination of the critical micellar concentration of perfluorinated surfactants by cyclic voltammetry at liquid/liquid interfaces. *Electrochimica Acta*. 263: 499-507.
- Wang J, Xiong X, Feng B. (2013). Effect of *Crataegus* usage in cardiovascular disease prevention: an evidence-based approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 149363.
- Wang R. (2009). Hydrogen sulfide: a new EDRF. *Kidney International*. 76, 700–704.
- Wen L, Lin Y, Lv R, Yan H, Yu J, Zhao H, Wang D. (2017). An efficient method for the preparative isolation and purification of flavonoids from leaves of *Crataegus pinnatifida* by HSCCC and pre-HPLC. *Molecules*. 22(5), 767.
- WHO (2023). Integrating traditional and complementary medicine into health systems: social, economic and health considerations. Technical Brief, June 7th, 2023. Geneva. <https://www.who.int/publications/m/item/integrating-traditional-and-complementary-medicine-into-health-systems--social--economic-and-health-considerations>.
- WHO (2023). Integrating traditional and complementary medicine into health systems: social, economic and health considerations. Technical Brief, June 7th, 2023. Geneva. <https://www.who.int/publications/m/item/integrating-traditional-and-complementary-medicine-into-health-systems--social--economic-and-health-considerations>
- Wu J, Peng W, Qin R, Zhou H. (2014). *Crataegus pinnatifida*: chemical constituents, pharmacology, and potential applications. *Molecules*. 19(2), 1685–1712.
- Xia M, Zhou X, Yao H, Jiang H, Bruce I, Wei E, Xia Q. (2005). Rutin-induced Endothelium-dependent Vasorelaxation in Rat Aortic Rings and the Underlying Mechanism. *Engineering in Medicine and Biology*. 5595-5597.

- Yang B, Liu P. (2012). Composition and health effects of phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus spp.*) of different origins. *Science of Food and Agriculture*. 92(8), 1578-1590.
- Yang R, Huang X, Dou J, Zhai G, Su L. (2013). Self-microemulsifying drug delivery system for improved oral bioavailability of oleanolic acid: design and evaluation. *International journal of nanomedicine*, 8, 2917–2926. <https://doi.org/10.2147/IJN.S47510>.
- Zarrei M, Talent N, Kuzmina M, Lee J, Lund J, Shipley P, Dickinson T. (2015). DNA barcodes from four loci provide poor resolution of taxonomic groups in the genus *Crataegus*. *AoB Plants*. 7, plv045.
- Zhang LL, Zhang LF, Xu JG. (2020). Chemical composition, antibacterial activity and action mechanism of different extracts from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge.). *Scientific reports*. (10), 8876.
- Zhang Q, Chang Z, Wang Q. (2006). Ursane Triterpenoids Inhibit Atherosclerosis and Xanthoma in LDL Receptor Knockout Mice. *Cardiovasc Drugs Ther*. 20, 349–357.
- Zhang X, Meng L, Lu Q, Fei Z, Dyson PJ. (2009) Targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells using modified single wall carbon nanotubes. *Biomaterials*. 30, 6041e7.
- Zhao Y, Vanhoutte P, Leung SW. 2015. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*. 129(2):83-94.
- Zhu S, Yan H, Niu K, Zhang S. (2015). Determinación simultánea de siete componentes de flavonoides de hojas de espino en plasma de rata por LC-MS / MS. *Journal of Chromatographic Science*. 53(6), 909–914.
- Zorniak M, Szydło B, Krzeminski T. (2017). *Crataegus* special extract WS 1442: up-to-date review of experimental and clinical experiences. *Journal of physiology and pharmacology*. 68(4), 521-526.
- Zuiter AS, Sawwan J, Abdallat AA. (2012). Designing universal primers for the isolation of DNA sequences encoding proanthocyanidins biosynthetic enzymes in *Crataegus aronia*. *BMC Research Notes*. 5, 427.

11. ANEXO

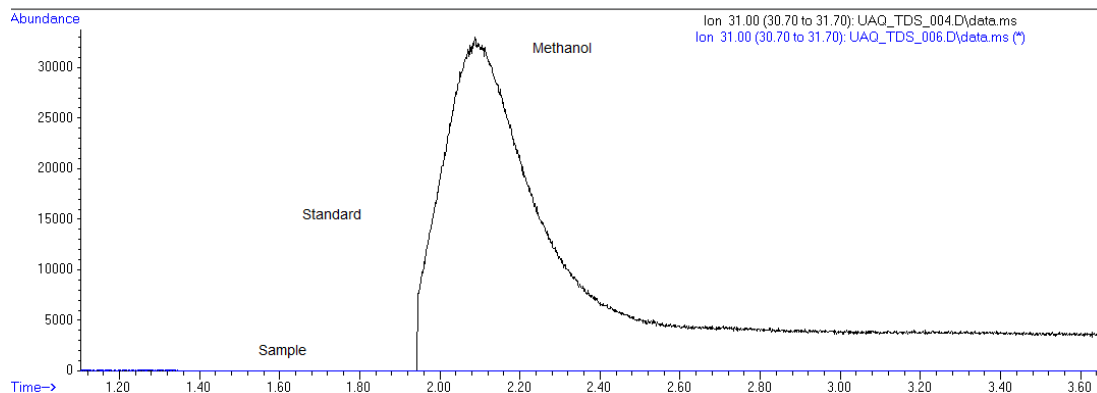


Figura 1A. Cromatograma obtenido del análisis del EMCr y del metanol puro.

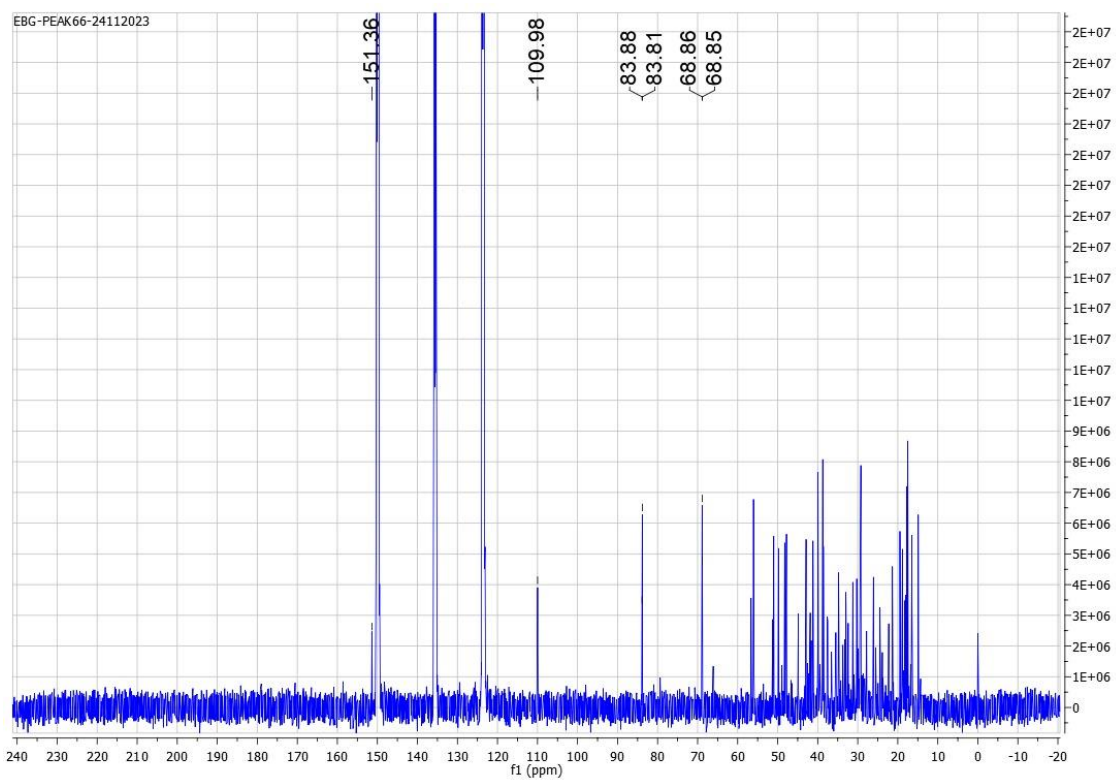


Figura 2A. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) del ácido alfitólico.

Tabla 1A. Resultados obtenidos de la caracterización de las formulaciones (M1-M10).

Formulación	Componentes	IdR	Tiempo de emulsificación (s)	Apariencia	Grado	TG (nm)	Potencial Z (mV)
M1	TH:80 L:10 TW:10	1.433 ± 0.001	49.3 ± 1.52	Traslúcida	A	146.8 ± 48	14.536 ± 0.405
M2	TH: 10 L: 80 TW: 10	1.456 ± 0.0005	29.6 ± 1.52	Opaca	C	3776 ± 1000	12.18 ± 1.12
M3	TH: 10 L: 10 TW: 80	1.461 ± 0.0005	ND	ND	ND	ND	ND
M4	TH: 45 L:45 TW:10	1.442 ± 0.00	31 ± 2	Opaca	C	241.3 ± 34	11.08 ± 0.36
M5	TH: 45 L: 10 T: 45	1.445 ± 0.00	48.33 ± 1.52	Opaca	C	634.0 ± 331	ND
M6	TH: 10 L: 45 TW: 45	1.459 ± 0.0005	120 ± 0	Traslucida	A	920 ± 944	ND
M7	TH: 33.33 L: 33.33 TW: 33.33	1.447 ± 0.0005	43.3 ± 2.08	Traslucida	A	170.03 ± 56	11.452 ± 2.960
M8	TH: 56.67 L: 21.67 TW: 21.67	1.441 ± 0.0005	51.6 ± 1.15	Traslucida	A	422 ± 249	10.136 ± 1.411
M9	TH: 21.67 L: 56.67	1.454 ±	48.3 ± 1.52	opaca	C	457 ± 10	13.848 ± 1.998

	TW: 21.67	0.00					
M10	TH: 21.67 L: 21.76 T: 56.67	1.455 ± 0.00	120 ± 0	Opaca	C	920.18 ± 944	ND

*TH: Transcutol HP

L: Labrasol

TW: TWEEN 60

Tabla 2A. Resultados obtenidos de la caracterización de las formulaciones (M11-M20).

Formulación	Componentes	IdR	Tiempo de emulsificación (s)	Apariencia	Grado	TG (nm)	Potencial Z (mV)
M11	TH:45 L: 30 TW: 25	1.433 ± 0.001	4.003 ± 0.767	Traslúcida	B	247 ± 2	4.536 ± 0.4
M12	TH: 40 L: 40 T: 20	1.456 ± 0.0005	26.5 ± 0.7	Traslucida	B	291 ± 14	4.0 ± 0.8
M13	TH:30 L: 30 TW: 40	1.461 ± 0.0005	ND	ND	ND	ND	ND

M14	TH:35 L: 35 TW: 30	1.442 ± 0.00	36.6 ±1.52	Traslúcida	B	456.3 ± 35	26.6 ± 0.7
M15	TH:60 L: 30 TW: 10	1.445 ± 0.00	28 ± 2.8	Traslúcida	A	156 ± 8	3.42 ± 0.13
M16	TH:35 L: 50 TW: 15	1.459 ± 0.005	26.33 ± 0.5	Traslúcida	A	146 ± 5	3.53 ± 0.336
M17	TH: 50 L: 35 TW: 15	1.4476 ± 0.00	18 ± 1.4	Traslúcida	A	106.8 ± 0.2	5.28 ± 0.272
M18	TH: 30 L: 45 TW: 25	1.441± 0.005	25.5 ± 0.7	Opaca	B	2720 ± 0	4.09 ± 0.600
M19	TH: 30	1.454	24.5 ± 0.7	Traslúcida	A	125 ± 20	3.4 ± 0.3

	L: 60 TW: 10	± 0.002					
M20	TH: 45 L: 45 T: 10	1.455 ± 0.002	29 ± 1.41	Traslúcidos	A	108 ± 2.4	2.23 ± 0.3

*TH: Transcutol HP
L: Labrasol
TW: TWEEN 60

Tabla 3A. Parámetros del hemograma de ratas macho sometidas a la administración repetida de SAME-Cr en dosis de 300, 500 y 1000 mg/kg de pc, el grupo satélite para observar la reversibilidad y los grupos control.

Tratamiento	Eritrocitos (x10 ⁶ /μL)	Leucocitos (/μL)	Hemoglobina (g/dL)	Neutrófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)
Control	7.90 ± 0.32	5.52 ± 1.79	16.52 ± 0.87	13.8 ± 2.95	82.6 ± 2.61	2.8 ± 0.84	0.8 ± 0.45	0 ± 0
300 mg/kg pc	8.25 ± 0.08	4.42 ± 1.86	16.48 ± 0.30	9.4 ± 2.6	87.6 ± 0.55	2.6 ± 2.6	0.4 ± 0.55	0 ± 0
500 mg/kg pc	7.68 ± 0.45	4.66 ± 1.33	15.58 ± 0.54	11.6 ± 6.3	83.2 ± 7.29	5.2 ± 2.38	0.6 ± 0.55	0 ± 0

1000 mg/kg pc	7.62 ± 0.21	4.98 ± 0.85	15.58 ± 0.45	13.6 ± 3.05	83 ± 3.39	2.2 ± 0.44	0.8 ± 0.84	0.4 ± 0.7
Control (satélite)	7.86 ± 0.08	7.24 ± 1.15	15.3 ± 0.27	13 ± 0	84.2 ± 1.64	2.8 ± 1.6	0 ± 0	0 ± 0
1000 mg/kg pc (satélite)	7.67 ± 0.36	4.36 ± 1.25	15 ± 0.6	18.2 ± 2.05	79.6 ± 2.05	1.2 ± 0.45	1 ± 1	0 ± 0

Tabla 4A. Parámetros del hemograma de ratas hembra sometidas a la administración repetida de SAME-Cr en dosis de 300, 500 y 1000 mg/kg de pc, el grupo satélite para observar la reversibilidad y los grupos control.

Tratamiento	Eritrocitos (x10 ⁶ /μL)	Leucocitos (/μL)	Hemoglobina (g/dL)	Neutrófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)
Control	7.4 ± 0.26	5.26 ± 1.35	14.7 ± 0.42	7.8 ± 5.31	89.2 ± 8.01	2.2 ± 1.79	1.2 ± 01.64	0 ± 0
300 mg/kg pc	7.19 ± 0.36	4.32 ± 0.68	14.8 ± 0.82	11.2 ± 3.42	85.8 ± 3.56	2.6 ± 1.67	0.8 ± 0.45	0 ± 0
500 mg/kg pc	7.35 ± 0.29	4.58 ± 0.53	14.96 ± 0.43	11.4 ± 4.09	85.6 ± 4.1	3.8 ± 1.09	0.6 ± 0.55	0 ± 0
1000 mg/kg pc	7.63 ± 0.0	4.2 ± 0	15.4 ± 0.0	12.4 ± 4.72	80.8 ± 5.3	5 ± 0	0.56 ± 0.4	0 ± 0

Control	8.04 ±	4.5 ±	15.58 ±	13.8 ±	81.6 ±	2.2 ±	2.4 ± 0.55	0 ± 0
(satélite)	0.94	1.07	0.33	2.49	2.60	0.83		
1000 mg/kg	7.82 ±	2.76 ±	15.14 ±	12.6 ±	80.8 ±	2.2 ±	1.8 ± 0.45	0 ± 0
pc (satélite)	0.44	1.05	0.99	4.56	3.89	0.84		

Tabla 5A. Perfil lipídico de ratas macho.

Tratamiento	Colesterol	Triglicéridos	HDL	LDL	VLDL	Índice aterogénico	Proteína C reactiva
Control	56 ± 9.9	131 ± 19.8	17.5 ± 3.5	12.5 ± 10.6	26.2 ± 3.9	3.15 ± 0.1	0 ± 0
300 mg/kg pc	45 ± 9.9	77 ± 36.8	15.5 ± 2.1	14.5 ± 0.7	15.4 ± 7.3	2.9 ± 0.4	0 ± 0
500 mg/kg pc	57 ± 8.5	146.5 ± 41.7	18 ± 2.8	15 ± 7.1	24.2 ± 1.2	3.1 ± 0	0 ± 0
1000 mg/kg pc	54.5 ± 2.1	82.5 ± 12	17 ± 2.8	21 ± 4.2	16.5 ± 2.4	3.25 ± 0.5	0 ± 0

Tabla 6A. Perfil lipídico de ratas hembra.

Tratamiento	Colesterol	Triglicéridos	HDL	LDL	VLDL	Índice aterogénico	Proteína C reactiva
Control	43.5 ± 2.1	68.5 ± 45.9	17 ± 1.4	13 ± 5.7	13.9 ± 9.5	2.65 ± 0.4	0 ± 0
300 mg/kg pc	51.3 ± 10	68.3 ± 13.7	16.7 ± 4.9	21 ± 4.4	13.7 ± 2.8	3.2 ± 0.6	0 ± 0
500 mg/kg pc	54.5 ± 4.9	120.5 ± 105	19.5 ± 6.3	17 ± 11.3	17.9 ± 12.4	2.9 ± 0.7	0 ± 0
1000 mg/kg pc	47.5 ± 3.5	80 ± 29.7	17.5 ± 2.1	13.5 ± 6.4	16.3 ± 6.2	2.8 ± 0.2	0 ± 0

PUBLICACIONES