

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

“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 INDIVIDUAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

REBECA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2021

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**

“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**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA  
REBECA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

DIRIGIDA POR  
Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

**SINODALES**

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

DIRECTOR

Dr. ELOY RODRÍGUEZ DE LEÓN

SINODAL

Dr. ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO

SINODAL

Dr. FRANCISCO LUNA VÁZQUEZ

SINODAL

DRA. SILVIA LORENA ANAYA LLANO  
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE TABLAS	v
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Enfermedades Cardiovasculares	1
1.1.1. Definición y epidemiología	1
1.1.2. Factores de riesgo	2
1.1.3. Principales enfermedades cardiovasculares	2
1.1.3.1. Hipertensión arterial (HTA) sistémica	2
1.1.3.2. Cardiopatía isquémica	3
1.1.3.3. Arteriosclerosis y Aterosclerosis	3
1.1.3.4. Angina de pecho	4
1.1.3.5. Insuficiencia cardiaca	4
1.1.3.6. Infarto al miocardio	5
1.2. Estructura y función de los vasos sanguíneos	5
1.2.1. Aparato cardiovascular	5
1.2.2. Vasos sanguíneos	6
1.2.3. Función	6
1.2.4. Estructura	6
1.2.5. Endotelio	8
1.3. Tratamiento convencional de la hipertensión	8
1.3.1. Tiazidas diuréticas	9
1.3.2. Bloqueadores de los canales del calcio (AC)	9
1.3.3. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA)	10
1.3.4. Antagonistas de los receptores de la angiotensina II	11
1.3.5. Betabloqueadores	11
1.4. Género <i>Crataegus</i>	12

1.4.1.	<i>Crategus rosei</i>	13
1.4.2.	Usos tradicionales	14
1.4.3.	Perfil químico	14
1.4.4.	Actividad antihipertensiva	15
1.5.	Taninos	15
2.	OBJETIVOS	16
2.1.	General	16
2.2.	Específicos	16
3.	METODOLOGÍA	17
3.1.	Materiales	17
3.1.1.	Material de estudio	17
3.1.2.	Material de laboratorio	17
3.1.3.	Equipos que se emplearon para la realización del proyecto	17
3.2.	MÉTODOS	18
3.2.1.	Obtención y conservación de la fracción de taninos	18
3.2.2.	Evaluación de la actividad vasodilatadora ex vivo	18
3.2.3.	Análisis estadístico	19
3.2.4.	Estudio químico de la fracción de taninos	19
3.2.4.1.	Condiciones para HPLC	20
3.2.4.2.	Análisis mediante el método acoplado HPLC-MS-MS	20
4.	RESULTADOS	22
4.1.	Rendimiento de la Fracción de Taninos (FT)	22
4.2.	Evaluación farmacológica	22
4.3.	Análisis por medio de HPLC/UV-Vis de la FT	23
4.4.	Identificación de (-)-epicatequina, rutina y vitexina	24
4.5.	Cuantificación de los compuestos identificados	26
4.5.1.	Método de análisis y cuantificación de flavonoides por medio de HPLC	26
4.6.	Confirmación de los compuestos identificados por HPLC-EM	29

4.6.1.	Confirmación de los compuestos identificados por HPLC-EM: estudio SRM	31
5.	DISCUSIÓN	33
5.1.	Evaluación farmacológica	33
5.2.	Actividad farmacológica de los compuestos identificados	33
5.3.	Identificación y cuantificación de los compuestos	35
6.	CONCLUSIONES	36
7.	PERSPECTIVA	36
8.	BIBLIOGRAFÍA	37
9.	ANEXOS	45

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Defunciones por enfermedades del corazón en México	1
2	Estructura de la pared arterial	7
3	Estructura de la pared arterial	7
4	Distribución geográfica de <i>Crataegus rosei</i> en México	13
5	Curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador de la FT, la ACh y el EM	22
6	Cromatograma de la FT	23
7	Cromatograma de Mezclas de estándares	24
8 A	Espectro UV-Vis del estándar vitexina	25
8 B	Espectro UV-Vis del pico con Rt de 25.39 en la FT	25
9	Cromatograma de la FT con compuestos identificados	26
10	Curva de calibración para (-)-epicatequina	27
11	Espectro de masas de baja resolución de la fracción de taninos de <i>C. rosei</i>	30
12	Cromatograma obtenido del método SRM	31

## INDICE DE TABLAS

Tabla		Pagina
1	Gradiente de las fases móviles para el análisis por medio de HPLC/UV-Vis de la FT	20
2	Gradiente método SRM	21
3	Tiempo de retención y longitud de onda de máxima absorción de los estándares y de los picos correspondientes en la FT	25
4	Concentración de (-)-epicatequina calculada por regresión lineal	27
5	Regresión lineal para el cálculo de los parámetros de validación	27
6	Parámetros de validación para la curva de calibración de (-)-epicatequina	28
7	Compuestos identificados en la FT, de acuerdo a los espectros de masas de baja resolución	30
8	Patrones de fragmentación de los estándares	31
9	Rendimiento de los compuestos cuantificados	32



## RESUMEN

Las plantas medicinales, no solo se siguen utilizando de manera tradicional, sino que además han sido fuentes primarias de principios activos de muchos medicamentos. Esas plantas tienen la ventaja sobre la química sintética, por ser grandes laboratorios donde se genera una amplia variedad de estructuras químicas, las cuales pueden tener diversas actividades farmacológicas, haciendo que una planta sea utilizada para enfermedades con etiología diferente. Además, los compuestos aislados de plantas han servido de fuentes de inspiración para el diseño y síntesis en laboratorio de análogos semi-, o totalmente sintéticos. Ejemplos famosos incluyen el antipalúdico natural quinina y las “quinas” análogas (cloroquina, nivaquina, flavoquina), así como el anestésico natural, pero adictivo, cocaína y sus análogos (procaína, lidocaína, benzocaína, etc.). Para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, hoy en día se recurre mucho a las plantas medicinales, entre ellas las del género *Crataegus*, lo cual se debe a los altos costos de los medicamentos patentados que los hace inaccesibles para la mayoría de los pacientes en todo el mundo. La presente tesis se enfocó en determinar la actividad vasodilatadora *ex vivo* de la fracción de taninos y la caracterización de algunos de sus constituyentes fenólicos. Para los ensayos farmacológicos, se utilizaron anillos de aorta aislada de rata y un polígrafo marca Grass, mientras que, para los estudios químicos, se recurrió a la cromatografía de líquidos de alta resolución donde se empleó un panel de los estándares fenólicos más comunes en plantas y que son los mayores vasodilatadores descritos. La fracción de taninos relajó la aorta de manera dependiente de la concentración, mostrando un efecto máximo del 100% con una  $CE_{50}$  de 61.25 [33.76 a 111]  $\mu\text{g/mL}$ . Dicho efecto relajante fue mayor que el producido por la acetilcolina utilizada como control. Los estudios químicos revelaron la complejidad de la muestra. Sin embargo, se identificaron la vitexina, la rutina, la (-)-epicatequina, el hiperósido, la quercetina y el ácido clorogénico.

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1. Enfermedades cardiovasculares

### 1.1.1. Definición y epidemiología

Las enfermedades cardiovasculares (EC) son un conjunto de desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos que tienen un gran impacto en la morbilidad y mortalidad de diversas partes del mundo, incluyendo México. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las EC son la causa principal de muerte en todo el mundo (OMS, 2015).

En México, datos estadísticos del INEGI del año 2018 reportan las enfermedades del corazón como el primer lugar entre las diez principales causas de muerte, con un número de fallecidos que ascendió a 149,368 defunciones, destacando en particular las enfermedades isquémicas del corazón. Del total de defunciones por ECV, las isquémicas representaron el 72.7% con 108,616 casos, seguidas por las hipertensivas, con 15.9% (23,715 casos) y las relacionadas con la circulación pulmonar y otras enfermedades del corazón con 10.9% (16,278 casos). A la fiebre reumática aguda y enfermedades cardíacas reumáticas crónicas, les correspondió en conjunto, el 0.5% (Figura 1) (INEGI, 2019).

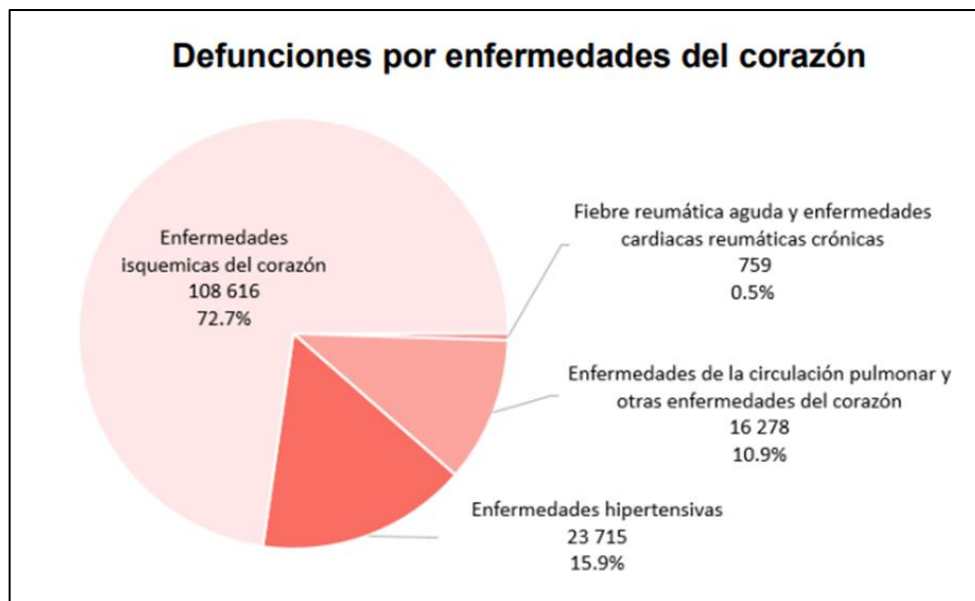


Figura 1. Defunciones por enfermedades del corazón en México.

### 1.1.2. Factores de riesgo

Las enfermedades cardiovasculares pueden ser condicionadas por diversos factores, entre los que sobresalen la edad y el sexo. Estos dos son no modificables (Baena y col., 2005). Otros factores, pero que son modificables, incluyen la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia, la diabetes mellitus y el tabaquismo (OMS, 2015). Por ejemplo, este último factor causa un efecto tóxico directo sobre el endotelio vascular, ya que provoca trastornos del metabolismo de los lípidos y estimula una respuesta inflamatoria por los macrófagos (Hernández y col., 2010).

Otros factores que se relacionan con las enfermedades cardiovasculares son el sedentarismo, la ingesta elevada de grasas saturadas y grasas *trans*, así como consumo excesivo de sodio y alcohol (Hernández y col., 2010). El término “factor de riesgo cardiovascular” puede utilizarse en dos sentidos: el primero y más extenso, que engloba a aquellos factores que se cree benefician el desarrollo y aparición de lo que denominamos enfermedad cardiovascular; b) el segundo que es aplicable exclusivamente a factores relacionados con cardiopatía coronaria. Según A. Jeremiah Stamler, a quien se le atribuye la primera mención del término de factor de riesgo cardiovascular (FRCV) en 1948, cualquier condición relacionada que involucre un riesgo de presentar algunas de las patologías cardiovasculares más comunes es considerada como factor de riesgo cardiovascular (Ruiz, 2003).

### 1.1.3. Principales enfermedades cardiovasculares

#### 1.1.3.1. Hipertensión arterial (HTA) sistémica

La hipertensión se define como la presión arterial (PA) alta que, como referencia, parte de tener una presión sistólica mayor de 140 mm Hg y una presión diastólica mayor de 90 mm Hg (Rosas y Borrayo, 2018).

La hipertensión desarrolla un estrés excesivo en la vasculatura (Hackfort y Mishra, 2016), por lo que constituye el factor de riesgo cardiovascular más común asociado con la enfermedad de la arteria coronaria y la muerte cardiovascular. La hipertensión arterial sistémica no tiene una etiología definida, cohabita

frecuentemente con diabetes, dislipidemia y obesidad, ya sea en pares o como síndrome metabólico y estos factores de riesgo tienen vías fisiopatológicas comunes y se sabe que uno potencia al otro respecto a la progresión del daño tisular (Rosas y Borrayo, 2018).

Existen factores como la edad, el tabaquismo, el estilo de vida sedentario, el alto consumo de sodio y grasas saturadas, presencia de enfermedades crónicas como diabetes, obesidad, dislipidemias, entre otras, que participan en la aparición de la hipertensión arterial (Franco, 2013).

#### 1.1.3.2. Cardiopatía isquémica

La cardiopatía isquémica es una enfermedad prevalente a nivel mundial, con una importante mortalidad. Se define como la enfermedad cardíaca producida como consecuencia de las alteraciones fisiopatológicas secundarias a la aparición de un desequilibrio entre la demanda y el aporte de oxígeno del músculo cardíaco. La causa más frecuente de cardiopatía isquémica es la enfermedad aterosclerótica de las arterias coronarias epicárdicas (Alcalá y col., 2017).

Sus dos formas clínicas generales de presentación, la irreversible y la reversible, tienen mecanismos fisiopatogénicos distintos. La irreversible presenta tres tipos de muerte celular: la necrosis, la apoptosis y la autofagia, mientras que en la reversible, la restauración de la función de las células cardiovasculares está determinada por factores como el restablecimiento temprano del flujo sanguíneo coronario y fenómenos de pre- y pos-acondicionamiento isquémico (Moreno y Portillo, 2016).

Esta patología está muy relacionada con los llamados factores de riesgo cardiovascular, entre los que destacan la edad, el sexo, la hipertensión arterial, el tabaquismo, la diabetes mellitus y la dislipidemia (Alcalá y col., 2017).

#### 1.1.3.3. Arteriosclerosis y Aterosclerosis

La aterosclerosis es un tipo específico de arteriosclerosis. Aunque algunas veces ambos términos se usan indistintamente, no son lo mismo, pero se catalogan como una enfermedad vascular inflamatoria crónica, progresiva (Custodio y col.,

2020; Lahoz y Mostaza, 2007). La palabra arteriosclerosis se refiere al concepto clásico de engrosamiento y endurecimiento de las arterias, fenómeno que puede aparecer en cualquier lugar del organismo (Alcalá y col., 2017). Por otra parte, la aterosclerosis es caracterizada por la acumulación de lípidos, especialmente la fracción conocida como lipoproteína de baja densidad (LDL), por debajo de la capa íntima de los vasos sanguíneos. El factor de riesgo más conocido y estudiado para el desarrollo de la arteriosclerosis o aterosclerosis es la obesidad, ya que este padecimiento puede causar otras afecciones que conllevan finalmente a padecer este tipo de enfermedades cardiovasculares (Custodio y col., 2020; Lahoz y Mostaza, 2007).

#### 1.1.3.4. Angina de pecho

Se define como angina, el dolor o malestar en el pecho que aparece como consecuencia de la falta de aporte de sangre al músculo cardíaco. La angina de pecho es una de las manifestaciones de la cardiopatía coronaria (CC), el tipo más común de enfermedad cardíaca (Giménez, 2004). Existe angina de pecho por esfuerzo, que a su vez se subdivide de acuerdo con el tiempo de evolución en *de novo*, que es estable y progresiva, y la espontánea. La primera se caracteriza por episodios transitorios de dolor precordial, precipitados por el ejercicio u otras situaciones que aumenten el consumo de oxígeno. La angina espontánea se caracteriza por episodios de dolor torácico que ocurren sin que haya una relación aparente con incrementos de las demandas de oxígeno por parte del miocardio. La angina de pecho es la consecuencia del desequilibrio entre las necesidades miocárdicas de oxígeno y las posibilidades de oferta del mismo por parte de la circulación arterial coronaria (Jadráque y col., 1988).

#### 1.1.3.5. Insuficiencia cardíaca

Se considera a la insuficiencia cardíaca (IC) como un síndrome clínico complejo y desde un punto de vista fisiopatológico, representa una situación en la que se reduce el gasto cardíaco por afectación de la capacidad ventricular de llenado o expulsión de sangre (López, 2013). Se inicia a partir de un episodio que

produce una disminución en la capacidad de bomba del corazón y en consecuencia, compromete la capacidad de los ventrículos de llenarse y bombear sangre de manera satisfactoria; de igual forma, es considerada el extremo final común de muchas de las enfermedades más prevalentes, como son la hipertensión arterial, la enfermedad coronaria, la diabetes mellitus y las valvulopatías, entre otras (Pereira y col., 2016).

#### 1.1.3.6. Infarto al miocardio

El infarto agudo al miocardio se define como la existencia de áreas de necrosis cardiaca en la anatomía patológica, así como aumento en los niveles de las enzimas cardiacas, en especial la troponina. Esta enfermedad se produce por la rotura de una placa inestable y rica en lípidos, lo que conlleva a la formación de trombo que obstruye, ya sea total o parcialmente, la luz de la arteria coronaria, provocando un déficit de riego distal. Cabe mencionar que ésta es la forma más frecuente secundaria a aterosclerosis. Existen otras causas como disección coronaria y embolia coronaria. También existen causas extracardiacas que disminuyen el flujo coronario o ayudan a que se genere la trombosis como anemia de células falciformes, estados de hipercoagulabilidad, inhalación de monóxido de carbono, entre otros (Franco, 2013).

Dentro de las manifestaciones clínicas más importantes, destaca el dolor de tipo angor, pero prolongado, intenso y que sucede cuando el paciente se encuentra en reposo. Este tipo de síntoma no se controla con nitratos sublinguales. El infarto se presenta por la mañana, al levantarse. Sus síntomas incluyen dolor epigástrico, infarto de localización inferior, disnea o síncope, sin presentarse dolor torácico previo (Franco, 2013).

### 1.2. Estructura y función de los vasos sanguíneos

#### 1.2.1. Aparato cardiovascular

El aparato cardiovascular es un sistema tubular cerrado que está compuesto por dos compartimientos unidos entre sí y en cuyo punto de intersección se

encuentra el corazón: la circulación menor (circulación pulmonar) y la circulación mayor (circulación sistémica). Tanto en la circulación menor como en la circulación mayor, el corazón bombea la sangre hacia las arterias, que la distribuyen. Dichas arterias se ramifican en forma sucesiva y en consecuencia se tornan cada vez más estrechas (Welsch, 2008).

#### 1.2.2. Vasos sanguíneos

El sistema vascular sanguíneo está compuesto por arterias, capilares y venas. Las arterias son los vasos sanguíneos que evacúan la sangre del corazón y las venas son los vasos que la devuelven a ese órgano (Welsch, 2008).

#### 1.2.3. Función

La principal función de los vasos sanguíneos es llevar la sangre rica en oxígeno y nutrientes desde el corazón hacia todos los tejidos y órganos. Otras funciones importantes son: la eliminación de dióxido de carbono y desechos metabólicos y la regulación de la interacción del sistema inmune periférico con todos los tejidos (Daneman y Prat, 2015).

#### 1.2.4. Estructura

Las paredes de los vasos sanguíneos están compuestas por capas de músculo liso, tejido conectivo elástico y tejido conectivo fibroso. La capa interna de todos los vasos sanguíneos es una lámina delgada llamada endotelio, un tipo de epitelio. El endotelio está rodeado por capas de tejido conectivo y músculo liso (Silverthorn y col., 2008) (Figura 2).

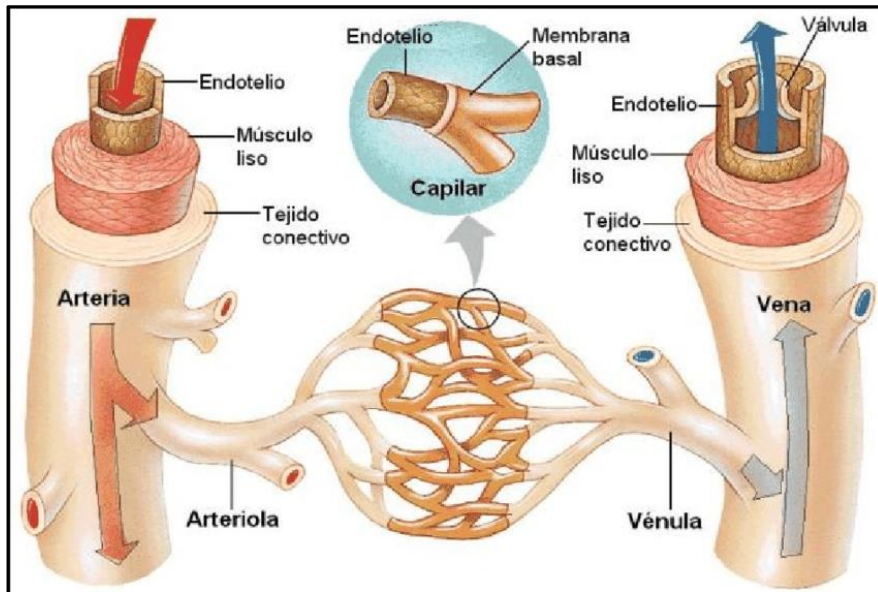


Figura 2. Estructura de los vasos sanguíneos (Zarrabeitia, 2015).

La estructura de los vasos sanguíneos se compone de tres capas: la túnica íntima, la túnica media y la túnica adventicia (Zarrabeitia, 2015) (Figura 3).

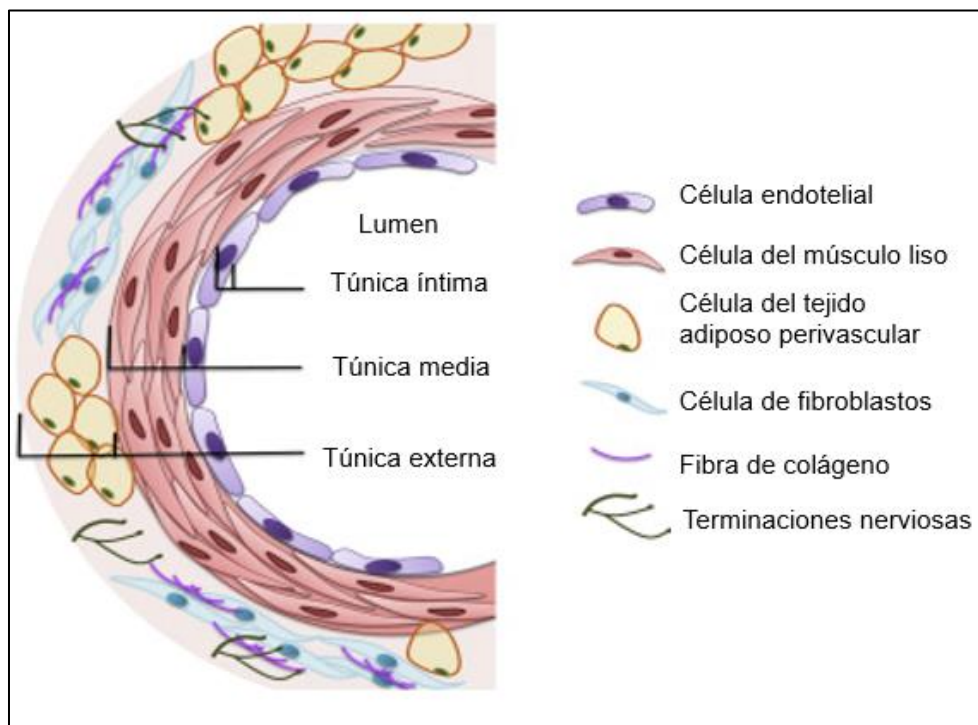


Figura 3. Estructura de la pared arterial (Zhao y col., 2015).



### 1.2.5. Endotelio

El endotelio es una barrera altamente selectiva y un órgano metabólicamente muy activo; está conformado por una monocapa de células endoteliales, mismas que forman el sistema circulatorio. Dichas células recubren las paredes de las arterias, venas, vasos y capilares.

El endotelio puede ser continuo o discontinuo. El continuo se caracteriza por células endoteliales conectadas unas con otras por una membrana basal continua. Sus uniones están formadas por complejos multiproteicos. El endotelio discontinuo es fenestrado. Las fenestraciones son poros transcelulares que se extienden a través del grosor de toda la célula (Carvajal, 2017).

La función principal del endotelio es la regulación y la perfusión sanguínea por todo el organismo a través de cambios del tono vascular a consecuencia de la producción de óxido nítrico. Otras de sus funciones importantes son el control de la coagulación, la fibrinólisis, la regulación de la adherencia plaquetaria, la función inmunológica, la intervención en el metabolismo lipoproteico, la migración celular, la angiogénesis y la regulación del volumen y contenido electrolítico intra y extravascular (Garmendia, 2014).

### 1.3. Tratamiento convencional de la hipertensión

La HTA es controlada con dos tipos de tratamientos: el no farmacológico y el farmacológico. El primero radica en las modificaciones del estilo de vida del paciente hipertenso; estas reflejan un impacto positivo tanto en el control de su presión arterial como en el tratamiento con fármacos. Los cambios en el estilo de vida pueden retrasar o prevenir de forma segura y eficaz la HTA en personas no hipertensas e incluso retrasar o prevenir el tratamiento farmacológico en pacientes con HTA de grado 1 (Pérez y col., 2017). En cuanto al tratamiento farmacológico, se consideran cinco clases mayores de agentes antihipertensivos, denominados fármacos de primera línea, que son aptos para el inicio y el mantenimiento del tratamiento antihipertensivo, solos o en combinación, los cuales son: tiazidas diuréticas, bloqueadores (o bloqueantes) de los canales del calcio (AC), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), antagonistas de los receptores

de la angiotensina II y betabloqueadores (BB) (Sánchez y col., 2010). Existen otros como los inhibidores de renina, los bloqueadores de los receptores alfa, los antialdosterónicos y los vasodilatadores directos que son utilizados como drogas de segunda línea o bien que son empleados en combinación con otros antihipertensivos (Pérez y col., 2017).

#### 1.3.1. Tiazidas diuréticas

Los diuréticos en el tratamiento de la hipertensión arterial controlan los valores de presión arterial en un importante porcentaje. El tratamiento con dosis altas de diuréticos, tales como 25 a 50 mg de Hidroclorotiazida una vez al día, eleva la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Su acción hipotensora se ejerce al bloquear la reabsorción tubular de sodio y disminuir el volumen plasmático (Padilla y col., 2006). La clortalidona y la hidroclorotiazida son los medicamentos de elección para iniciar tratamiento hipotensor en la mayor parte de los pacientes hipertensos. Otros diuréticos empleados en el tratamiento de la HTA son los ahorradores de potasio, de los cuales, los más utilizados son la espironolactona, el triantireno y la amilorida, que son administrados conjuntamente con los diuréticos tiazídicos para limitar las posibles pérdidas de potasio (Pérez y col., 2017). Los diuréticos tiazídicos son los fármacos con mayor evidencia en relación con el efecto benéfico cardiovascular, seguidos muy de cerca por los IECAS. Sin embargo, pueden ocasionar dislipidemia e intolerancia a la glucosa. Otros efectos adversos conocidos de estos fármacos son: hiponatremia, hipocalemia y gota (Andrade, 2015).

#### 1.3.2. Bloqueadores de los canales del calcio (AC)

Los antagonistas de los canales de calcio (AC) constituyen un grupo diverso de fármacos, cuyo mecanismo de acción radica en el bloqueo de los canales de calcio (Ca) dependientes de voltaje. Estos canales son la principal vía de entrada de  $Ca^{2+}$  en las células del músculo liso vascular (Bendersky y col., 2017). La acción vasodilatadora de los AC se ejerce al interferir la entrada de los iones de calcio a las células, principalmente a la célula muscular lisa de los vasos sanguíneos, con lo

que dificultan sus acciones constrictivas y disminuyen la resistencia periférica, lo cual contribuye a la regulación del tono arterial y la presión arterial (Pérez y col., 2017). Como describe Morr y col. en el 2007, los AC se clasifican en 3 grupos, de acuerdo a su estructura química: dihidropiridínicos (nifedipina, amlodipina, felodipina, lecardipina), derivados de las fenilalkilaminas (verapamilo) y derivados de la benzotiazepina (diltiazem), existiendo diferencias entre los mismos en cuanto a su efecto sobre la frecuencia cardíaca y sobre el nódulo atrioventricular (AV). Otra clasificación está relacionada con el tipo de canal de calcio que bloquean. Con ese enfoque, pueden dividirse en bloqueadores de los canales L (dihidropiridínicos, benzotiazepínicos, fenilalquilaminas), bloqueadores de los canales T (mibefradil) y mixtos (bloqueadores de los canales L y de sodio) (Morr y col., 2007). Los dihidropiridínicos presentan reacciones adversas, fundamentalmente al inicio del tratamiento o al aumentar la dosis. Las alteraciones más frecuentes dentro de este tipo de fármacos son: cardiovasculares (palpitaciones, hipotensión, enrojecimiento, edema en pies y tobillos y fatiga), sobre el sistema nervioso central (vértigo, cefaleas y somnolencia) y gastrointestinales (náuseas, dispepsia, sequedad de boca e hiperplasia gingival). El verapamilo, por su parte, puede producir bloqueo auriculoventricular (Olmedillo, 2017).

### 1.3.3. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA)

La acción fundamental de estos fármacos es la inhibición de la transformación de la enzima angiotensina I en angiotensina II, con lo que se obtiene una limitación del efecto vasoconstrictor de esta enzima a nivel periférico (Pérez y col., 2017). Se clasifican en tres grupos: IECA con radical sulfhidrilo (captoprilo), IECA con radical carboxilo (benazeprilo, cilazaprilo, enalaprilo, espiraprilo, lisinoprilo, perindropilo, quinalaprilo, ramiprilo, trandolaprilo) y IECA con radical fosfínico (fosinopril) (Díaz, 2000). Los IECA son excelentes en monodosis o en combinación con otros antihipertensivos, principalmente con diuréticos (Pérez y col., 2017). En general, son fármacos bien tolerados en tratamientos de larga duración cuando son administrados a las dosis recomendadas. Las reacciones adversas son

poco frecuentes, aun así, las que llegan a presentarse son: hipotensión, hipercaliemia, fallo renal, angioedema y tos (Díaz, 2000).

#### 1.3.4. Antagonistas de los receptores de la angiotensina II

Los antagonistas de los receptores de la Angiotensina II (ARA 2 o AT1) ejercen su acción vasodilatadora al bloquear la enzima angiotensina II cuando interactúan con los aminoácidos del dominio transmembrana del receptor AT1, previniendo la unión del agonista (Jaimes y col., 2009). Los fármacos de elección son: valsartán, losartán, irbesartán, candesartán y telmisartán, con variadas dosificaciones, una de sus ventajas es el efecto antihipertensivo duradero que se obtiene con una sola dosis al día (Pérez y col., 2017). Las reacciones adversas para estos fármacos suelen ser leves y transitorias como por ejemplo vértigos, mareo o fatiga que desaparecen al suspender el tratamiento y que se van atenuando en los días posteriores (Garay y col., 2017).

#### 1.3.5. Betabloqueadores

Los fármacos betabloqueadores tienen un efecto antihipertensivo, antiarrítmico y antiisquémico, los cuales han sido demostrados en múltiples escenarios clínicos, fisiológicos y patológicos (López y col., 2011). Su acción farmacológica se da por el bloqueo de los receptores adrenérgicos. El resultado de su efecto hipotensor, cuyos mecanismos no están totalmente esclarecidos, considera que estos medicamentos disminuyen el gasto cardiaco (Pérez y col., 2017). Es importante recalcar que la guía del 2007 de las Sociedades Europea de Hipertensión y Cardiología, así como su actualización del 2009, mantuvieron a los betabloqueadores como medicamento de primera línea, pero en los últimos años, se ha replanteado su estatus debido a que se han publicado diversos estudios que arrojan una variabilidad residual de la presión arterial sistólica en pacientes tratados, la cual se asocia con un riesgo elevado de eventos cardiovasculares (Salinas, 2011). De utilidad probada en el tratamiento de la HTA son atenolol y metoprolol, como cardioselectivos, y propranolol, bisoprolol y nadolol entre los no cardioselectivos (Pérez y col., 2017). En su mayoría, son fármacos bien tolerados.

Sin embargo, quienes los utilizan pueden experimentar alguno de los siguientes efectos adversos que ocurren a diferentes niveles como: cardiovasculares (bradicardia e hipotensión), respiratorios (broncoespasmo y rinitis vasomotora), sistema circulatorio periférico (vasoconstricción periférica), metabolismo (potenciación y prolongación de la hipoglucemia insulínica, variación de los lípidos plasmáticos e hiperuricemia) y sistema nervioso central (fatiga, depresión, insomnio, alucinaciones visuales, delirio y reacciones psicóticas) (Martínez y Mármol, 2017).

#### 1.4. Género *Crataegus*

Los remedios tradicionales, entre ellos las plantas medicinales, se han convertido en un tema de importancia mundial, con implicaciones medicinales y económicas. Las plantas del género *Crataegus* pertenecen a la familia *Rosaceae*, subtribu *Pyrinae*, lo que formalmente constituye la subfamilia *Maloideae*. Están ampliamente distribuidas. Hasta el año 2011, se había reportado que el género estaba constituido aproximadamente por 140 especies dispersas en todo el mundo, las cuales se dividen en 40 series, cuyas dos terceras partes se encuentran en Norteamérica y el resto en Europa y Asia (Núñez y Hernández, 2011). Dichas plantas se han utilizado durante mucho tiempo en la medicina popular para el tratamiento de diversas dolencias.

Hay una serie de fitoquímicos medicinalmente activos que han sido aislados del género, con la mayoría de los datos generados en estudios de aquellas especies que son nativas de Europa y Asia. Comparativamente, poco se sabe sobre las especies norteamericanas. El género *Crataegus* es uno de los complejos taxonómicos más difíciles de tratar. Errores del pasado causan equivocaciones en la identificación de especies de este género; también existen nombres científicos que causan confusión en la determinación taxonómica. En otros países, a las plantas del género *Crataegus*, se les conoce como Espino y en México, el nombre más común para las especies del género *Crataegus* es el “tejocote”, derivado del Náhuatl “te-xocotl” que significa fruta dura y agria. El tejocote ha sido aprovechado desde la época prehispánica en México y está íntimamente ligado a la cultura tradicional mexicana (Núñez y Hernández, 2011).

#### 1.4.1. *Crataegus rosei*

Phipps en el año de 1997 reportó 13 especies de *Crataegus* nativas del norte y centro de México, de las cuales nueve son endémicas, tres son compartidas con los Estados Unidos de América y una con Perú y Ecuador (Núñez y col., 2008). También Phipps y colaboradores, en el año 2003, clasificaron a las especies mexicanas en 6 series: *Parvifoliae*, *Mexicanae*, *Madrenses*, *Greggianae*, *Baroussanae* y la *Crus-galli* (Núñez y Hernández, 2011).

En la serie *Crus-galli*, se encuentran las especies *Crataegus gracilior* y *C. rosei*. Es hasta 1997 que Phipps dio a conocer dos subespecies, la *C. rosei* subsp. *rosei* (Eggl.) J.B. Phipps y *C. rosei* subsp. *parryanana* (Eggl.) J.B. Phipps. Las subespecies se encuentran distribuidas en las montañas de la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental, en la Meseta Mexicana, a lo largo del Cinturón Volcánico Trans Mexicano y en el Altiplano de Chiapas en México (Figura 4) (Piedra y col., 2016).

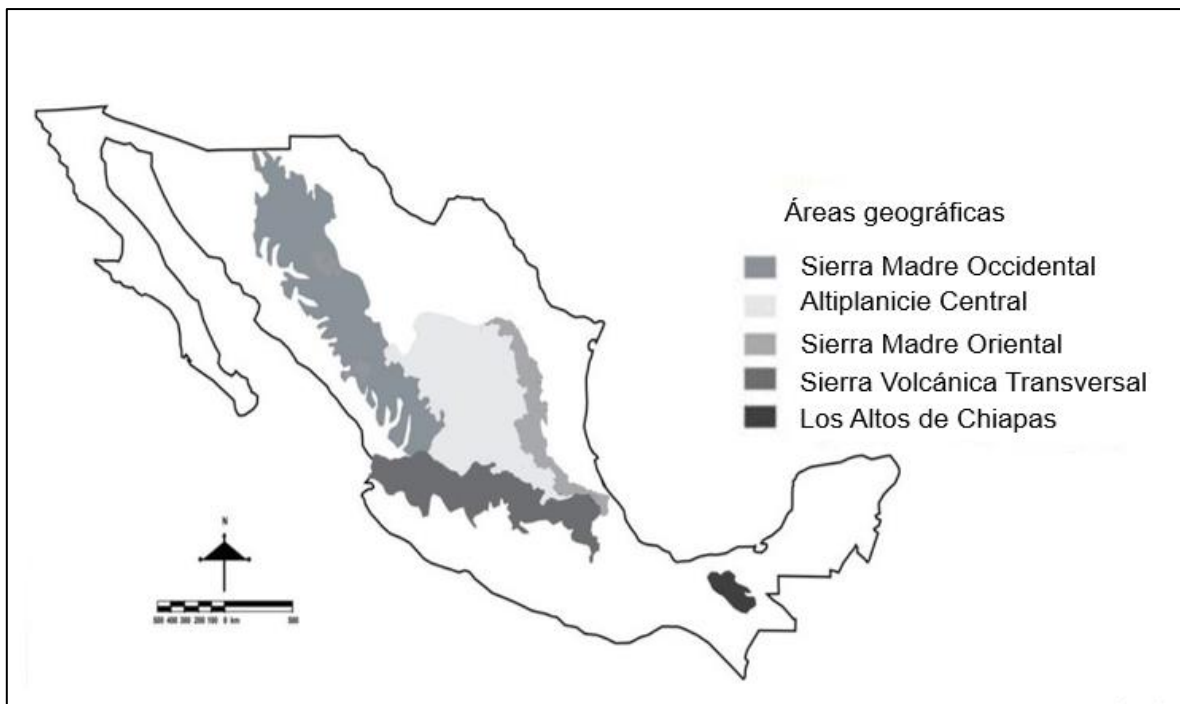


Figura 4. Distribución geográfica de *Crataegus rosei* en México (Modificada de Piedra y col., 2016).

#### 1.4.2. Usos tradicionales

Las especies de *Crataegus* (tejocote) se han utilizado tradicionalmente desde tiempos antiguos. Además, se ha propuesto que sus componentes antioxidantes explican sus efectos terapéuticos beneficiosos (Kumar y col, 2012). Desde la década de 1800, los productos naturales que contiene el tejocote se han utilizado en América del Norte para el tratamiento de problemas cardíacos como hipertensión, angina de pecho, arritmia, y la insuficiencia cardíaca congestiva (Wang y col., 2013). Tradicionalmente, las tribus nativas americanas usaban tejocote (*Crataegus spp.*) para tratar dolencias gastrointestinales y problemas cardíacos, y consumían la fruta como alimento.

En América del Norte, en Canadá en particular, los llamados “natural health products (NHPs)”, derivados de (*Crataegus spp.*), han sido utilizados en el tratamiento de problemas relacionados con el corazón. También se consideran entre los más importantes usos del tejocote. Estos productos incluyen los obtenidos a partir de especies de *Crataegus*, que están ampliamente disponibles en Europa, Asia y América del Norte. Los productos disponibles incluyen tinturas, tabletas, cápsulas, tés y extractos acuosos de hojas, flores y frutas, que se comercializan actualmente como un tratamiento alternativo para la hipertensión, la angina de pecho, la arritmia y las primeras etapas de la insuficiencia cardíaca (Edwards, y col, 2012). En México, la diabetes se trata con extractos de tejocote; este tratamiento puede ser de considerable beneficio, especialmente durante las primeras etapas de la enfermedad (Kumar y col, 2012).

#### 1.4.3. Perfil químico

Las hojas, flores y bayas del tejocote contienen una variedad de complejos similares a bioflavonoides que parecen ser los principales responsables de las acciones cardíacas de las plantas (Kumar y col., 2012). Las investigaciones de *Crataegus* se centran típicamente en la identificación y cuantificación de flavonoides y antocianinas, que han demostrado tener actividad farmacológica. Los principales flavonoides que se encuentran en *Crataegus* son el hiperósido, la vitexina y

derivados glicosilados adicionales de estos compuestos (Edwards y col, 2012). Otros componentes químicos incluyen vitamina C, saponinas, taninos, aminas cardiotónicas (feniletilamina, tiramina, isobutilamina, o-metoxi feniletilamina, colina y acetilcolina), derivados de la purina (adenosina, adenina, guanina, migdalina), ácidos triterpénicos, entre ellos el ursólico (Verma y col, 2007).

#### 1.4.4. Actividad antihipertensiva

Se ha observado que una fracción que contiene hiperosido y el extracto acuoso de *Crataegus tanacetifolia* previenen la hipertensión inducida por L-NAME en ratas y tiene efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular (Kocyildiz y col., 2006). En otro estudio, las gotas combinadas de alcanfor y bayas de *Crataegus* (CCC) disminuyen la caída ortostática de la presión arterial (Belz y col., 2002).

#### 1.5. Taninos

Los taninos (polifenoles) son metabolitos secundarios que se encuentran en los vegetales. Comúnmente, los podemos localizar en algunas familias como *Leguminosae*, *Rosaceae*, *Polygonaceae*, *Fagaceae*, *Rhizophoraceae*, *Myrtaceae* y *Melastomataceae*. Estos metabolitos poseen cinco características especiales: son solubles en agua, tienen pesos moleculares entre 500 y 3000 o hasta 5000 Daltones, estructuras y carácter polifenólico, de 12 a 16 grupos fenólicos y 5 a 7 anillos aromáticos por cada 1000 unidades de masa molecular relativa, complejación intermolecular y su característica estructural puede ser de proantocianidinas (o taninos condensados) y taninos hidrolizables (Isaza, 2007).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. General

Determinar la actividad vasorrelajante de la fracción de taninos obtenidos del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei* e identificar sus principales compuestos fenólicos.

### 2.2. Específicos

- Obtener la fracción de taninos a partir del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei*.
- Determinar la actividad vasorrelajante de la fracción de taninos en segmentos de aorta aislada de rata.
- Identificar los principales compuestos fenólicos vasorrelajantes presentes en la fracción de taninos.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Material de estudio

Extracto metanólico obtenido a partir de las hojas de *Crataegus rosei*.

##### 3.1.2. Material de laboratorio

Se emplearon los siguientes disolventes para la extracción de los taninos: metanol, éter de petróleo, acetato de etilo, 1-butanol de grado reactivo analítico y una solución de cloruro de sodio al 1% en agua (masa/volumen: m/v).

Para la evaluación de la actividad vasodilatadora *ex vivo*, se emplearon la fracción de los taninos obtenidos del extracto metanólico y las soluciones indicados en el procedimiento estandarizado por Ibarra y col. (2010).

Se utilizó material de vidrio de uso común en laboratorio (vasos de precipitado, matraces, embudos, probetas, etc.).

##### 3.1.3. Equipos que se emplearon para la realización del proyecto

- Rotaevaporadores (marca BÜCHI, modelo B-480) y bombas de vacío de diferente alcance para el secado de los taninos obtenidos del extracto metanólico.
- Para el análisis de los compuestos mayoritarios de los taninos, se utilizaron columnas analíticas de fase reversa XDB-C18 (4.6 x 150 mm con tamaño de poro de 5-microns) (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA) y una columna analítica de fase reversa C18 Synergi (2 x 100 mm, 2.5 micrómetros).
- Las muestras fueron analizadas utilizando dos sistemas cromatográficos: a) Un cromatógrafo de líquidos integrado por una bomba cuaternaria de entrega automática de disolventes, modelo e2695 (Waters) y un detector de arreglo de diodos (UV-Visible), modelo 2998 (Waters: Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA). La adquisición y el procesamiento de los datos obtenidos de este sistema se llevaron a cabo utilizando el programa Empower3 (Waters). b)

Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (TSQ Endura de Thermo Scientific).

- En la evaluación del efecto vasodilatador, se trabajó con un polígrafo de marca Grass 7D con un transductor de desplazamiento de fuerza Grass FT03.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Obtención y conservación de la fracción de taninos

Se pesaron 30 g del extracto metanólico seco obtenido según la metodología descrita por López (2019), los cuales fueron disueltos en metanol. La solución se sometió a lavados con éter de petróleo con la finalidad de eliminar las grasas y clorofilas. Posteriormente, el extracto se llevó a sequedad total. El extracto totalmente seco se disolvió con acetato de etilo y se extrajeron los taninos con una solución acuosa de cloruro de sodio al 1% en agua (m/v). En seguida, se realizaron extracciones de la solución salina que contiene los taninos, utilizando 1-butanol. Se recuperó la fracción orgánica que se llevó a sequedad total. Los taninos secos se conservaron en refrigeración y de tal manera que no quedaran expuestos a la luz. Luego, se determinó su actividad vasodilatadora sobre aorta aislada de rata.

### 3.2.2. Evaluación de la actividad vasodilatadora *ex vivo*

La evaluación de la actividad vasodilatadora de los taninos se realizó mediante un procedimiento previamente estandarizado por Ibarra y col. (2010). En ese ensayo, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso aproximado de 275-325 g y, posteriormente, las ratas fueron sacrificadas por decapitación conforme a lo que indica la NOM-062-ZOO-1999. Se extrajo la aorta torácica y se colocaron en solución de Krebs-Henseleit (NaCl 126.8 mM, KCl 5.9 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 30 mM y D-glucosa 5.0 mM con un pH de 7.4) oxigenada con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>). La aorta se lavó con una solución de Krebs-Henseleit para evitar la formación de coágulos intravasculares. Se eliminó el tejido conectivo y se cortaron en anillos de 4 a 5 mm de longitud, los cuales se sujetaron entre ganchos de acero inoxidable en cámaras de incubación

de 5 mL con solución de Krebs-Heinseleit a 37 °C y con un burbujeo constante de carbógeno. Los tejidos se equilibraron durante 60 minutos bajo una tensión de 1.5 g. Durante este período, el medio del baño se cambió cada 15 min. Después del ajuste final a la tensión basal de 1.5 g, los segmentos aórticos fueron contraídos con KCl 100 mM. Cuando se estabilizó la contracción, el medio de baño se cambió para rehabilitar la tensión basal de 1.5 g. Posteriormente, se contrajeron los tejidos con 1  $\mu$ M de L-fenilefrina y se registró la fuerza de contracción desarrollada, la cual fue definida como el 100%. En cuanto la contracción se mostró estable, se añadió la muestra a evaluar, la cual fue preparada en diluciones a diferentes concentraciones (0.1–1000  $\mu$ g/mL) disueltas en agua. Se utilizó como control positivo la acetilcolina (ACh, 1  $\mu$ M). La tensión isométrica se midió con un transductor de desplazamiento de fuerza Grass FT03 unido a un polígrafo de marca Grass 7D. Las respuestas se expresaron como el porcentaje de la contracción inicial alcanzada al adicionar la L-fenilefrina.

### 3.2.3. Análisis estadístico

Se realizaron 6 evaluaciones de la fracción de taninos. Los datos obtenidos se ajustaron a una ecuación sigmoideal y se graficaron mediante el programa PRISMA 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) para la obtención de las curvas concentración-respuesta. Los valores de  $CE_{50}$  se tomaron como significativamente diferentes cuando sus intervalos de confianza de 95% no se traslapen entre ellos y se determinó el efecto máximo ( $E_{max}$ ) con un error estándar.

### 3.2.4. Estudio químico de la fracción de taninos

Los análisis cromatográficos por HPLC se realizaron en un cromatógrafo de líquidos de la marca Waters descrito en el apartado 4.1.3., utilizando los métodos descritos a continuación (Tabla 1) con las condiciones adecuadas para una separación óptima y cuantificación de los constituyentes individuales.

Para la identificación de los compuestos individuales, se utilizó la coelución con estándares comunes disponibles en el laboratorio, los cuales incluyeron los ácidos gálico, *para*-cumárico y caféico, además de los flavonoides (+)-catequina,

(-)-epicatequina, kaempferol, rutina, Hesperetina, vitexina, apigenina, genisteína, quercetina, naringina y naringenina. La identificación de los compuestos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención y de los espectros de UV-Vis de los picos presentes en el cromatograma de la muestra de taninos con los de los estándares que coeluyeron. Para la cuantificación de los compuestos identificados a través de la obtención de curvas de calibración, se emplearon las 2 condiciones diferentes descritas a continuación.

#### 3.2.4.1. Condiciones para HPLC

Se implementaron las siguientes condiciones: gradiente con fases móviles de H<sub>2</sub>O acidulada con ácido fosfórico (999:1) y MeOH acidulado con ácido fosfórico (999:1); flujo de 0.8 mL por min; longitud de onda ( $\lambda_{max}$ ) de detección de 280 nm. El gradiente que se utilizó se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Gradiente de las fases móviles para el análisis por medio de HPLC/UV-Vis de la FT.

Tiempo (min)	MeOH:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
0	0%	100%
45	100%	0%
55	0%	100%
65	0%	100%

#### 3.2.4.2. Análisis mediante el método acoplado HPLC-MS-MS

En colaboración con SIASA LAB (Servicio Integral a la Industria, S.A. De C.V, Querétaro), se realizó la confirmación de los compuestos previamente identificados mediante la técnica de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.

Se realizaron dos tipos de análisis. El primero consistió en hacer un escaneo de masas completo de la fracción FT mediante la infusión (inyección) directa en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (TSQ Endura de Thermo Scientific) empleando como método de ionización la electroaspersión (electrospray ionization: ESI). Las condiciones de la fuente de ionización fueron las siguientes: modo negativo, 350 °C (temperatura del vaporizador), 300 °C (línea de transferencia),

presión del gas auxiliar: 7.97 L/min, presión del gas envolvente: 4.58 L/min, voltaje de la fuente: 3000 V. La búsqueda se hizo en el rango de 100 a 700 uma. Para la “infusión” directa, se utilizó una bomba de jeringa externa, la cual inyectó la solución de la FT a un flujo de 50 uL por minuto. La FT se mezcló en la entrada de la fuente de ionización con la fase móvil A (0.0125 N Ac. Acético en H<sub>2</sub>O) la cual se inyectó a un flujo de 300 uL por minuto.

El segundo análisis consistió en un estudio SRM (de sus siglas en inglés: Selected Reaction Monitoring) para búsqueda de reacciones específicas de los compuestos previamente identificados (rutina, [(–)-epicatequina, vitexina]. Para ello, se hizo la optimización de los estándares correspondientes a los compuestos identificados. Las condiciones de la fuente fueron las siguientes: modo de ionización: negativo, temperatura del vaporizador: 330 °C, línea de transferencia: 250 °C, presión del gas auxiliar: 7.97 L/min, presión del gas envolvente: 4.58 L/min, voltaje de la fuente: 3960 V. La búsqueda se hizo de acuerdo al patrón de fragmentación de cada estándar.

La inyección de la FT se realizó mediante cromatografía de alta resolución para la cual se utilizó una columna descrita en el apartado 4.1.3. Se implementaron las siguientes condiciones:

Modo gradiente con 2 fases móviles (A y B), las cuales fueron constituidas por una mezcla que contiene 95% de agua acidulada con ácido acético a una concentración de 0.0125N y 5% de acetonitrilo (fase A) y una mezcla de 50% de agua acidulada con ácido acético a una concentración de 0.0125N y 50% de acetonitrilo (fase B); temperatura: 40 °C, flujo: 0.35 mL por min. El gradiente que se utilizó se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Gradiente método SRM.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Fase A</b>	<b>Fase B</b>
<b>0.0</b>	0.0%	100%
<b>2.0</b>	0.0%	100%
<b>5.0</b>	22.5%	77.5%
<b>10.0</b>	100%	0.0%
<b>12.0</b>	0.0%	100%
<b>15.0</b>	0.0%	100%

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Rendimiento de la Fracción de Taninos (FT)

De los 30 g del extracto metanólico seco, se obtuvo 0.313 g de la fracción de taninos, la cual se conservó bajo refrigeración y protegida de la luz hasta su posterior uso.

### 4.2. Evaluación farmacológica

El efecto vasodilatador de la FT fue dependiente de la concentración, con una  $CE_{50}$  de 61.25 [33.76 a 111]  $\mu\text{g/mL}$  ( $E_{\text{max}}$ : 100%). En contraste, el EM presentó una  $CE_{50}$  de 55.49 [37.31 a 82.52]  $\mu\text{g/mL}$  ( $E_{\text{max}}$ :  $78.01 \pm 3.03\%$ ). La FT presentó mayor eficacia que la ACh ( $E_{\text{max}} = 69.50 \pm 5.75\%$ ) utilizada como control positivo y que el extracto metanólico (Figura 5).

A pesar de que las potencias de la FT y del EM son similares, la FT presentó mayor eficacia que el EM y que la ACh.

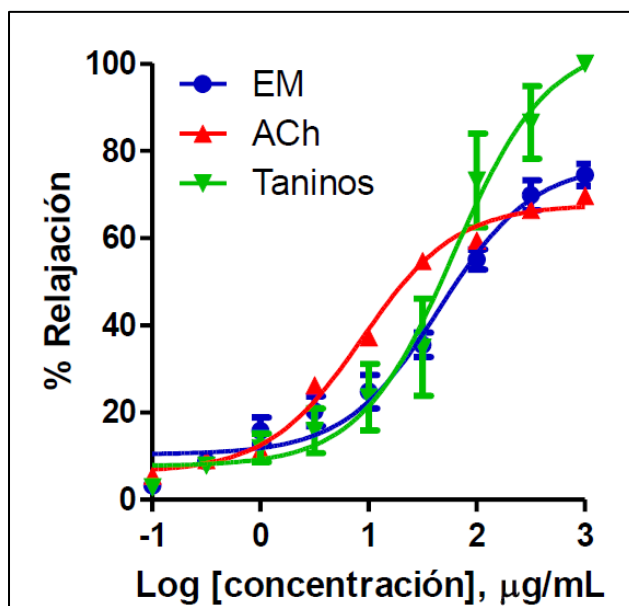


Figura 5. Curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador de la FT, la ACh y el EM.

Estos resultados nos indican que los compuestos polares presentes en la FT contribuyen al efecto vasorrelajante del extracto metanólico. Ese efecto permitió continuar con el análisis químico de la fracción.

#### 4.3. Análisis por medio de HPLC/UV-Vis de la FT

De acuerdo con el análisis químico por medio de la técnica cromatográfica HPLC acoplada a UV-VIS, se observó la presencia de diversos compuestos en la FT (Figura 6). Este cromatograma se comparó con otro obtenido del análisis de una mezcla de estándares de compuestos polares (Figura 7). Los resultados mostraron coincidencia en 4 picos con tiempos de retención y  $\lambda_{\max}$  similares. Los picos correspondientes a tiempos de retención de 19.74, 20.44, 25.37 y 27.50 minutos, como se muestra en la Figura 6, concuerdan con los picos presentes en la FT analizada con los picos correspondientes a 18.36, 20.50, 25.39 y 27.53 minutos respectivamente, por lo que se decidió analizar individualmente los estándares y cotejar con los picos de la FT.

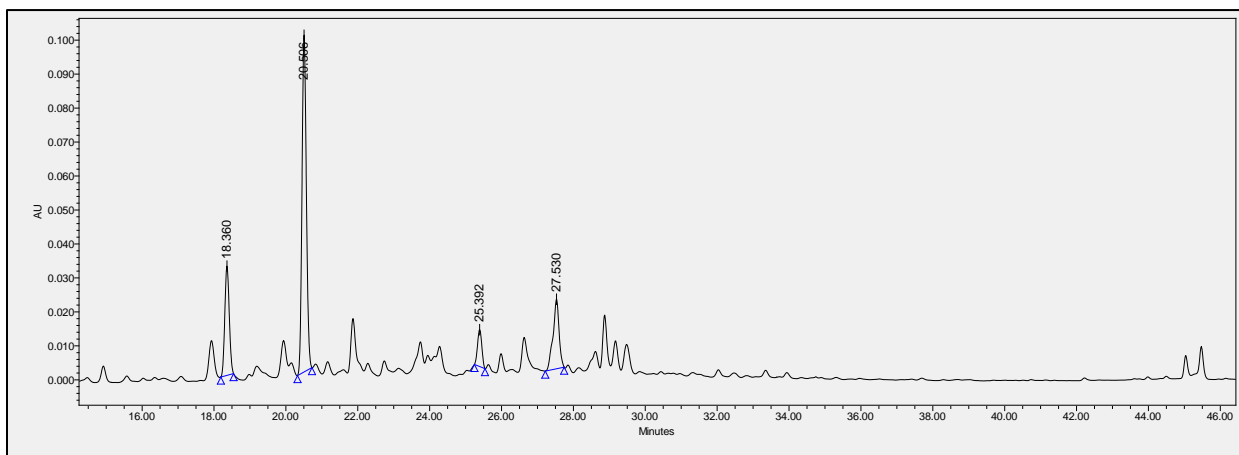


Figura 6. Cromatograma de la FT. Columna: Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ ); gradiente: H<sub>2</sub>O acidulada (999:1)-MeOH acidulado (999:1); flujo: 0.8 mL por min (280 nm).



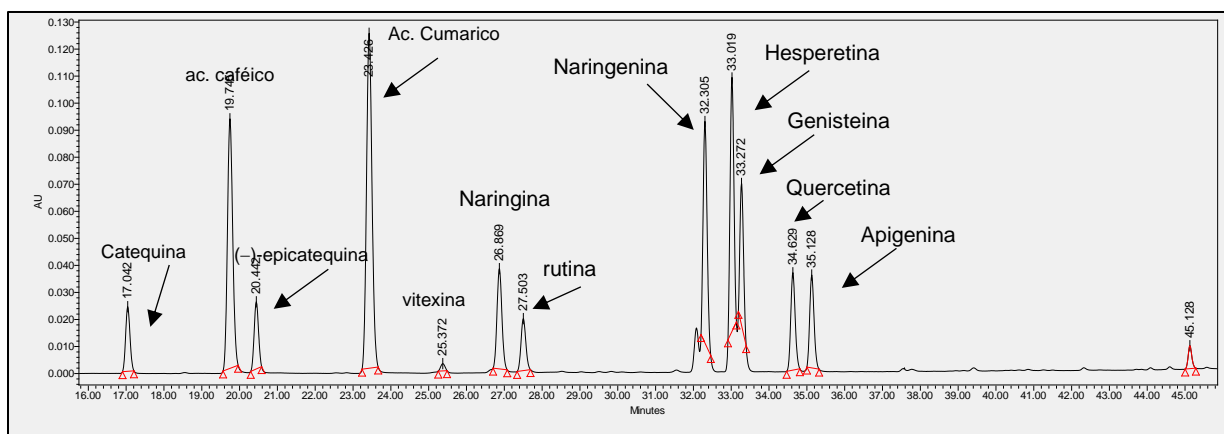


Figura 7. Cromatograma de Mezclas de estándares: columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ ); gradiente H<sub>2</sub>O acidulada (999:1)-MeOH acidulado (999:1); flujo: 0.8 mL por min (280 nm).

#### 4.4. Identificación de (-)-epicatequina, rutina y vitexina

Para la identificación de cada uno de los compuestos fenólicos en la FT, se determinó la presencia del estándar (Figura 7) a través de su tiempo de retención (Rt) y las longitudes de onda de máxima absorción ( $\lambda_{\max}$ ) del pico correspondiente en la FT (Figura 6). El mismo procedimiento se realizó para cada uno de los compuestos. Como ejemplo, se muestra lo correspondiente a la vitexina en la Figura 8A, en la cual se observan las  $\lambda_{\max}$  del estándar en 213.4 nm, 267.8 nm y 337.0 nm, las que coincidieron con las de la Figura 8B con  $\lambda_{\max}$  de 213.4 nm, 267.8 nm y 338.2 nm, correspondiente al pico con Rt de 25.39 min en la FT. En la Tabla 3 se muestra un resumen de los tiempos de retención y longitud de onda máxima de los estándares que coincidieron con los picos presentes en la FT.

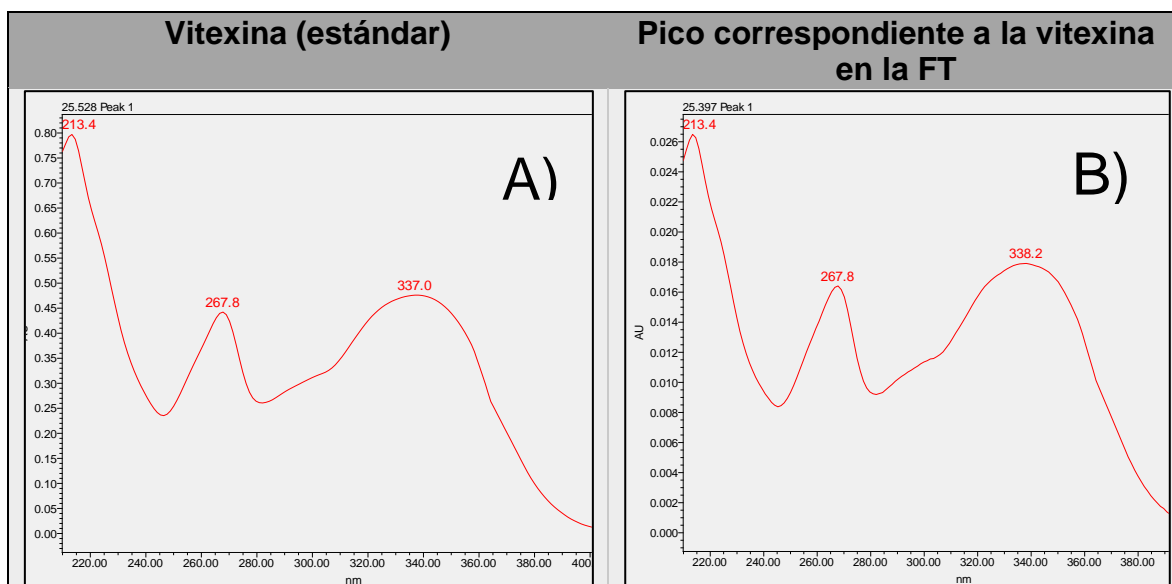


Figura 8A y 8B. A) espectro UV-Vis del estándar vitexina; B) espectro UV-Vis del pico con Rt de 25.39 en la FT.

Tabla 3. Tiempo de retención y longitud de onda de máxima absorción de los estándares y de los picos correspondientes en la FT.

Fenólico	Rt (min) (FT)	Rt (min) (Estándar)	$\lambda_{\max}$ (nm) (FT)	$\lambda_{\max}$ (nm) (Estándar)
Ácido caféico	18.36	19.74	216.9	216.9
			241.7	239.4
			325.0	323.8
(-)-Epicatequina	20.50	20.44	278.5	278.5
Vitexina	25.39	25.37	213.4	213.4
			267.8	267.8
			338.2	337.0
Rutina	27.53	27.50	254.8	254.8
			354.9	354.8

De esta manera, se logró determinar que los picos presentes en la FT corresponden a los estándares ya mencionados por lo que se puede marcar a cada uno de ellos con su compuesto identificado en el cromatograma de la FT ilustrado en Figura 9.

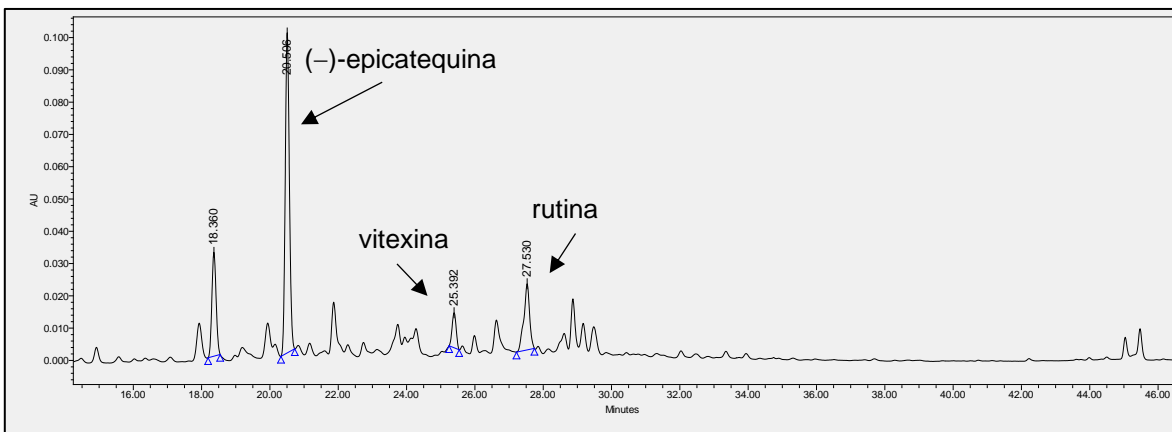


Figura 9. Cromatograma de la FT con compuestos identificados: columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ ); gradiente: H<sub>2</sub>O acidulada (999:1)-MeOH acidulado (999:1); flujo: 0.8 mL por min (280 nm).

#### 4.5. Cuantificación de los compuestos identificados

Al identificar los compuestos fenólicos, se continuó con la cuantificación de cada uno de ellos, a excepción de la vitexina. Para esto, se construyó una curva de calibración. Dicha curva se construyó con 5 concentraciones conocidas diferentes: 0, 200, 400, 600, 800 y 1000  $\mu$ g/ml. Se muestra ejemplo en la Figura 10.

##### 4.5.1. Método de análisis y cuantificación de flavonoides por medio de HPLC

En la Figura 10, se muestra como ejemplo la curva de calibración de la (-)-epicatequina, en la cual se puede observar que el punto rojo referente al pico correspondiente a (-)-epicatequina en la FT entra dentro de la curva. Se cuantificó la (-)-epicatequina en base al área bajo la curva, utilizando la ecuación de la recta, resultando en 228.081  $\mu$ g de (-)-epicatequina por mL de solución de la FT (Tabla 4). Por otra parte, mediante el método de regresión lineal (Tabla 5), se determinaron los límites de cuantificación (LQ) y de detección (LD) que se muestran en la Tabla 6, los cuales fueron calculados como se indican en las fórmulas descritas en la misma tabla.

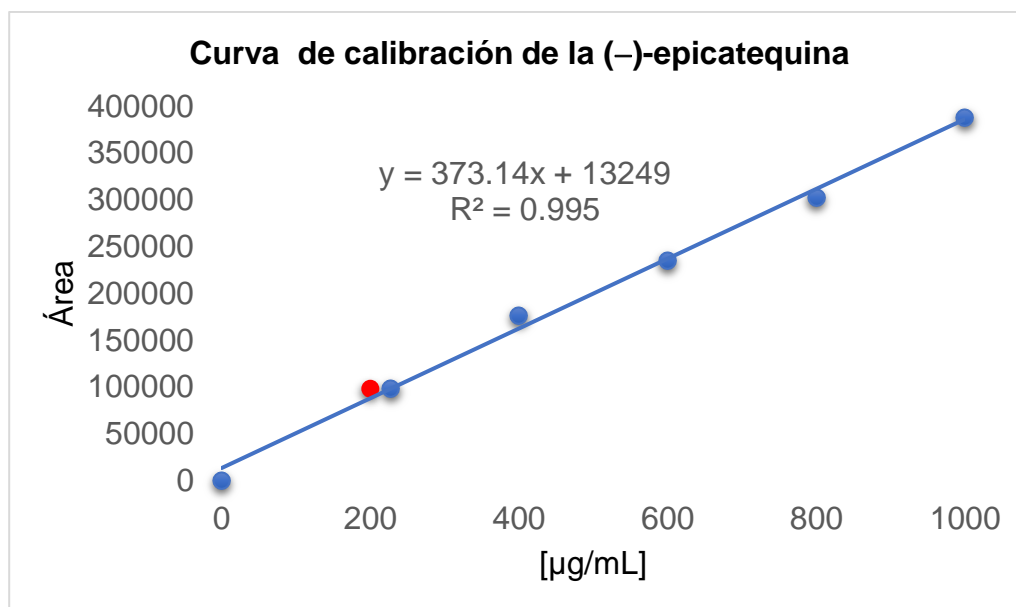


Figura 10. Curva de calibración para (-)-epicatequina.

Tabla 4. Concentración de (-)-epicatequina calculada por regresión lineal.

[FT]	Área experimental. Pico con Rt 20.50 min	[epicat] calculada
10 mg/1.5 mL	98355	228.081 µg/mL de solución de FT

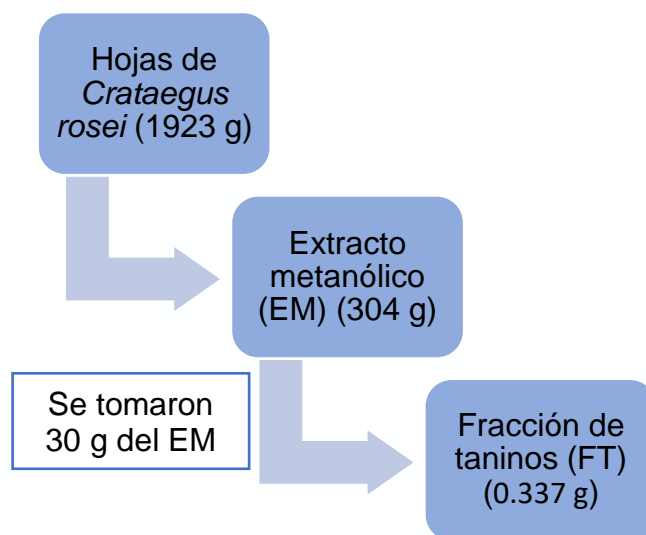
Tabla 5. Regresión lineal para el cálculo de los parámetros de validación.

x	y	$y^{\wedge} = 373.14x + 13249$		
[epicat]	Área	$y^{\wedge}$	$y^{\wedge} - y$	$(y^{\wedge} - y)^2$
0	0	13249	13249	175536001
200	97971	87877	-10094	101888836
400	175532	162505	-13027	169702729
600	235079	237133	2054	4218916
800	302645	311761	9116	83101456
1000	387677	386389	-1288	1658944

Tabla 6. Parámetros de validación para la curva de calibración de (-)-epicatequina.

Parámetro	Fórmula	Valor calculado
<b>S<sub>x/y</sub></b>	$\sqrt{\frac{\sum(y^{\wedge} - y)^2}{n - 2}}$ <p>(Gao y col.,2018) Donde n es el # de concentraciones utilizadas para construir la curva.</p>	9452.5734
<b>LD</b>	$\frac{S_{x/y} * 3}{m}$ <p>(Gao y col.,2018) Donde m es la pendiente.</p>	75.9975
<b>LQ</b>	$\frac{S_{x/y} * 5}{m}$ <p>(Gao y col.,2018) Donde m es la pendiente.</p>	126.6625

De acuerdo con las concentraciones calculadas, a partir de la curva de calibración de la (-)-epicatequina y la rutina, se determinó que por cada kg de hoja seca de *Crataegus rosei* se obtienen 9.48 mg de (-)-epicatequina y 2.717 mg de rutina. Como ejemplo, se detalla el cálculo para la (-)-epicatequina. Dichas concentraciones se calcularon a partir del siguiente análisis.



$$[1.5 \text{ mL sol de FT}] \left[ 228 \frac{\mu\text{g de epi}}{\text{mL}} \right] = 342 \mu\text{g de epi en } 10 \text{ mg de FT}$$

$$\left[ \frac{342 \mu\text{g de epi}}{10 \text{ mg}} \right] = 34.2 \mu\text{g de epi/mg de FT}$$

$$0.337 \text{ g de FT} \left[ \frac{34.2 \text{ mg de epi}}{1 \text{ g de FT}} \right] = 11.52 \text{ mg de epi}$$

$$\left[ \frac{11.52 \text{ mg de epi}}{30 \text{ g de EM}} \right] = 0.384 \frac{\text{mg de epi}}{\text{g de EM}}$$

$$1 \text{ g de hojas de } C. \text{ rosei} \left[ \frac{304 \text{ g de EM}}{1923 \text{ g de hojas de } C. \text{ rosei}} \right] = 0.158 \text{ g de EM}$$

$$0.158 \text{ g de EM} \left[ \frac{0.384 \text{ mg de epi}}{1 \text{ g de EM}} \right] = 0.060 \text{ mg de epi}$$

$$0.158 \frac{\text{g de EM}}{\text{g de hoja de } C. \text{ rosei}} \left[ \frac{0.060 \text{ mg de epi}}{1 \text{ g de EM}} \right] = 0.00948 \frac{\text{mg de epi}}{\text{g de hoja de } C. \text{ rosei}}$$

$$0.00948 \frac{\text{mg de epi}}{\text{g de hoja de } C. \text{ rosei}} \left[ \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} \right]$$

$$= 9.48 \text{ mg de epi por cada kg de hoja de } C. \text{ rosei}$$

#### 4.6. Confirmación de los compuestos identificados por HPLC-EM

En la Figura 11 se representa un espectro de masas general de la FT, el cual fue obtenido mediante electroaspersión (“electrospray”) en método de ionización negativa. En dicho espectro, se encuentran marcadas y señaladas las masas correspondientes a los 6 compuestos fenólicos identificados. El pico de m/z 373.33 podría corresponder al 8-metoxicirsileneol, el cual ha sido reportado en *Baccharis pentlandii* (Tarqui y col., 2012). En la Tabla 7 se resume los compuestos identificados.

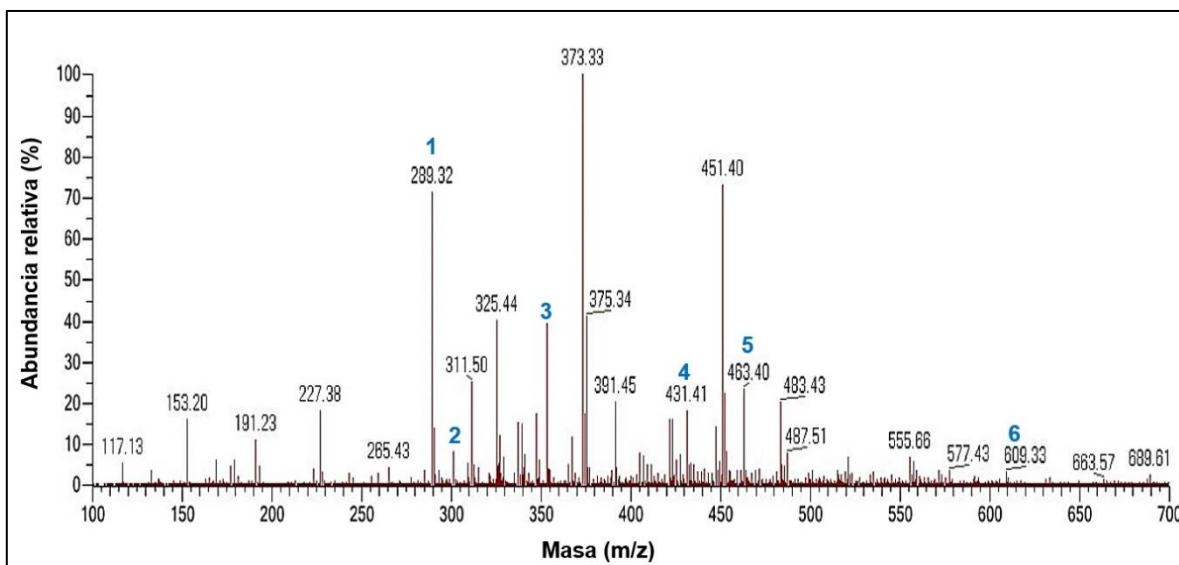


Figura 11. Espectro de masas de baja resolución de la fracción de taninos de *C. rosei*.

Tabla 7. Compuestos identificados en la FT, de acuerdo a los espectros de masas de baja resolución (Figura 11).

Compuesto	Masa experimental [M – H] <sup>+</sup>	Masa calculada	Diferencia en masa
(–)-Epicatequina (1)	289.34	290.26	0.08
Quercetina (2)	301.20	302.23	0.03
Ácido clorogénico (3)*	353.45	354.31	0.14
Vitexina (4)	431.47	432.28	0.19
Hiperósido (5)*	463.43	464.38	0.05
Rutina (6)	609.53	610.51	0.02

\*No identificados mediante HPLC/UV-Vis

Como se aprecia en el espectro de masas anterior, hay otros compuestos fenólicos mayoritarios (m/z 153.20, 191.23, 227.38, 311.50, 325.44, 373.33 (predominante), 375.34, 391.45, 451.40y 483.43) que no han sido todavía identificados. La identificación de esos podría lograrse combinando una intensa búsqueda bibliográfica y la realización de experimentos de fragmentación de tipo masa/masa (EM/EM).

#### 4.6.1. Confirmación de los compuestos identificados por HPLC-EM: estudio SRM

En la Tabla 8, se muestra el patrón de fragmentación de cada uno de los estándares elegidos para confirmar su presencia en la FT.

Tabla 8. Patrones de fragmentación de los estándares

Estándar	Precursor (m/z)	Fragmentos (m/z)
<b>(-)-epicatequina</b>	288.91	203.00
		205.03
		245.00
<b>vitexina</b>	430.95	283.07
		311.00
		340.97
<b>rutina</b>	609.00	255.00
		271.00
		299.97

La confirmación de los compuestos fenólicos identificados [(-)-epicatequina, rutina y vitexina], se logró por medio del método SRM a través un análisis HPLC-EM (Figura 12).

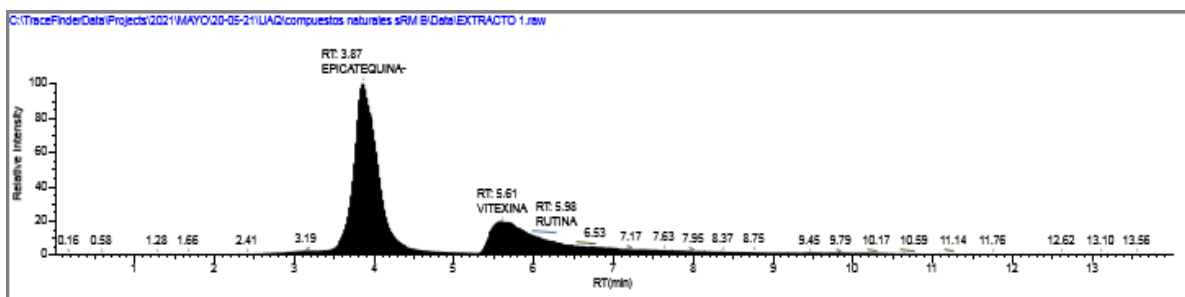


Figura 12. Cromatograma obtenido del método SRM.



Finalmente, se determinaron los rendimientos de dos de los compuestos confirmados (Tabla 9).

Tabla 9. Rendimientos de los compuestos cuantificados.

<b>Compuesto</b>	<b>[ ] Calculada por la curva de calibración</b>	<b>[ ] Calculada en FT seca</b>	<b>[ ] Calculada por kg de hojas secas</b>	<b>Porcentaje en peso en FT</b>	<b>Porcentaje en peso de hojas secas</b>
(-)-Epicatequina	228.081 µg en 1.5 mL solución de FT	34.2 µg/mg de FT	9.48 mg	3.41%	0.000948%
Rutina	292.988 µg en 1 mL solución de FT	9.76 µg/mg de FT	2.717 mg	0.975%	0.000271%

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Evaluación farmacológica

La actividad vasodilatadora de las especies de *Crataegus* ha sido atribuida en general a los compuestos fenólicos presentes en sus extractos. Dichos compuestos son polares y por lo tanto, se encuentran en fracciones de mayor polaridad, como lo es la de taninos (FT) extraídos del extracto metanólico de las hojas de esta planta. Por eso, se decidió abordar de manera independiente los estudios químicos y farmacológicos de dicha fracción. Como se observa en la Figura 5, la fracción de taninos del extracto metanólico produjo un efecto vasodilatador mayor que el del extracto metanólico que le dio origen, indicando una mayor concentración de compuestos vasodilatadores, entre los que se logró identificar, hasta este momento, seis diferentes compuestos fenólicos, algunos de los cuales se habían caracterizado en el género. Para esa identificación, se utilizaron dos sistemas cromatográficos de alta resolución, con 2 detectores diferentes. Mediante el detector de ultravioleta-visible (HPLC/UV-Vis), la identificación se basó en los tiempos de retención y los espectros UV-Vis. Por su parte, con el detector de masas (HPLC-masas), se pudo confirmar la identidad de 3 de los compuestos detectados mediante UV-Vis (la (-)-epicatequina, la vitexina y la rutina). Sin embargo, el ácido caféico que se consideró presente en la fracción a través del primer método no se pudo confirmar de manera contundente en el método HPLC-masas. En este último, se caracterizaron 3 compuestos más, el ácido clorogénico, la quercetina y el hiperósido, mediante el análisis de los espectros de masas. En dicho espectro (Figura 11), se aprecia un gran número de compuestos que faltarían por identificar.

### 5.2. Actividad farmacológica de los compuestos identificados

En cuanto a las actividades de los compuestos caracterizados sobre el sistema cardiovascular, se ha comprobado que todos ejercen efectos, en particular para controlar la hipertensión. La hipertensión y la disfunción endotelial han sido asociadas con una reducción de la síntesis y la disponibilidad del vasodilatador NO.

Se ha corroborado de manera experimental que la (-)-epicatequina modula la presión sanguínea, promoviendo el aumento y la restauración de los niveles de NO en la vasculatura. Dicho compuesto reduce la presión sanguínea y mejora la vasorrelajación en ratas espontáneamente hipertensas mediante un mecanismo que involucra el NO (Galleano y col., 2013).

Por su parte, la quercetina reduce de manera significativa la presión sanguínea sistólica (-18%), así como la diastólica (-23%), la media (-21%) y el ritmo cardiaco (-12%) en ratas espontáneamente hipertensas, pero no en ratas normotensas, lo cual es muy favorable para los consumidores de fuentes de este compuesto muy ubicuo en plantas. Esos datos demuestran que la quercetina reduce la presión arterial alta y la hipertrofia cardiaca y renal, sin ejercer efecto alguno en las ratas normotensas (Duarte y col., 2001).

Aunque diferentes estudios clínicos llevados a cabo en poblaciones asiáticas han demostrado que la ingesta de ácido clorogénico reduce de manera estadísticamente significativa las presiones sanguíneas sistólica y diastólica, se considera que la variedad en los diseños experimentales hace necesarias evaluaciones a mayor escala para alcanzar datos contundentes sobre los beneficios de este metabolito (Onakpoya y col., 2015).

La vitexina forma parte de los metabolitos secundarios presentes en el muy famoso extracto estandarizado WS 1442 preparado a partir de especies de *Crataegus*. Dicho extracto es muy utilizado a nivel clínico para tratar principalmente la insuficiencia cardiaca, pero también la hipertensión (Holubarsch y col., 2018). Coincidentemente, la vitexina ejerce *per se* un efecto hipotensor, aunque no mediante una acción vasodilatadora, ni bloqueante de receptores adrenérgicos alfa y beta, sino que dicho beneficio ha sido atribuido a su efecto diurético, a diferencia de los compuestos anteriores (Al-jeboory y col., , 2006).

La rutina ejerce efectos antihipertensivos, hipotensores y cronotrópicos negativos. Se sostiene que su actividad antihipertensiva podría ejercerse a través de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (CE50 = 66.01 µg/mL), con la cual se une de manera óptima (Ganga et al., 2019).

Finalmente, al hiperósido se le han atribuido efectos antiisquémicos y en general cardioprotectores (Wang y col., 2018).

### 5.3. Identificación y cuantificación de los compuestos

Combinando dos métodos analíticos, se pudieron identificar seis compuestos fenólicos (Tabla 7). Sólo 2 de ellos, que fueron identificados mediante HPLC/UV-Vis pudieron ser cuantificados. El rendimiento en porcentaje de la (-)-epicatequina y la rutina se muestra en la Tabla 9, tanto para la FT, como en las hojas de *Crataegus rosei*. Podemos observar que ambos compuestos representan menos de 1% de un kg de hojas secas. Esas cantidades pueden considerarse muy pequeñas en comparación con las que se reportaron para otras especies del género. Edwards y col. en el año 2012 reportaron que para las hojas de *Crataegus monogyna*, el contenido de (-)-epicatequina es aproximadamente entre 1.35 a 21.78 mg/g, mientras que para las hojas de *Crataegus cueata*, el contenido de rutina es de 0.1389 mg/g. La diferencia en cuanto a lo reportado es enorme. Sin embargo, el contenido cuantificado en este trabajo no puede inferirse como el total en las hojas de *Crataegus rosei*, debido a que se trabajó únicamente a partir de la FT. Otras fracciones polares, no pertenecientes a la FT, pudieran contener varios de esos compuestos.

Todos los compuestos identificados en el presente trabajo también han sido descritos en otras especies del género *Crataegus* (Kolodziej y col., 1984; Shahat y col., 2002; Bahorun y col., 2003; Liu y col., 2010; Edwards y col., 2012) (Anexo A-19).

## **6. CONCLUSIONES**

La fracción de taninos (FT) objeto de este estudio relajó la aorta de manera dependiente de la concentración y se determinó que posee una mayor eficacia que el EM que le dio origen, lo cual puede atribuirse a la concentración de los compuestos fenólicos en dicha fracción y a la eliminación de posibles antagonistas.

Se logró identificar a seis de los múltiples compuestos fenólicos que componen la FT, todos ellos con efecto vasodilatador.

Cinco de los compuestos identificados ejercen actividades hipotensoras, aunque a través de diferentes mecanismos que pueden complementarse para reducir la presión sanguínea.

## **7. PERSPECTIVA**

Una siguiente etapa con esta fracción podría contemplar la caracterización química de la mayoría de los compuestos no identificados, lo cual puede lograrse mediante el estudio detallado de los espectros de masas, que a su vez puede ser complementado con la separación y la purificación de dichos compuestos y su elucidación estructural a través del registro y análisis de sus espectros de resonancia magnética nuclear. Finalmente, se recomienda evaluar la actividad vasodilatadora de los compuestos cuyos efectos en ese modelo biológico no han sido determinados, con la finalidad de buscar nuevos agentes antihipertensivos naturales.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

**Andrade C.** Hipertensión arterial primaria: tratamiento farmacológico basado en la evidencia. *Revista Medicina Interna de México.* **2015**;31:191-195.

**Alcalá J,** Maicas-Bellido C, Hernández P, Rodríguez L. Cardiopatía isquémica: concepto, clasificación, epidemiología, factores de riesgo, pronóstico y prevención. *Revista Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado.* **2017**;12:2145-2152.

**Al-jeboory A,** Kawa F, Dizaye K. Cardiovascular effects of Vitexin isolated from *Prosopis farcta*. *Iraqi Journal of Pharmacy.* **2006**;6:14-19.

**Baena J,** Del Val García J, Tomàs J, Martínez J, Martín R, González I, Piñol P. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo en atención primaria. *Revista Española de Cardiología.* **2005**;58:367-373.

**Bahorun T,** Aumjaud E, Ramphul H, Rycha M, Luximon-Ramma A, Trotin F, Aruoma O. Componentes fenólicos y capacidades antioxidantes de los extractos de callos de *Crataegus monogyna* (Espino). *Revista Nahrung / Food.* **2003**;47:191-198.

**Belz G,** Butzer R, Gaus W, Loew D. Camphor-Crataegus berry extract combination dose-dependently reduces tilt induced fall in blood pressure orthostatic hypotension. *Journal Phytomedicine.* **2002**;9:581-588.

**Bendersky M** y Rodríguez P. **2017.** Antagonistas cálcicos en el tratamiento de la hipertensión arterial y enfermedades asociadas. *Gador Al cuidado de la vida.* Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial.

**Carvajal C.** El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. Revista Medicina Legal de Costa Rica, **2017**;34:90-100.

**Custodio J,** Lezama R, Reyes E. La activación plaquetaria como factor desencadenante de la inflamación y la aterosclerosis. Revista Cirugía y Cirujanos. **2020**;8:233-243.

**Daneman R,** Prat A. The Blood–Brain Barrier. Journal Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. **2015**;7:a020412.

**Díaz S.** Inhibidores de la enzima angiotensina convertasa (IECA). Farmacología e indicaciones terapéuticas. Revista Farmacia y Sociedad. **2000**;19:88-88.

**Duarte J,** Pérez R, Vargas F, Ocete M, Pérez F, Zarzuelo A, Tamargo J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. British Journal of Pharmacology. **2001**;133:117–124.

**Edwards J,** Brown N, Talent N, Dickinson T, Shipley P. A review of the chemistry of the genus Crataegus. Journal Phytochemistry. **2012**;79:5–26.

**Franco E.** Cardiología y Cirugía cardiovascular. 6a. Edición. Madrid. Editorial AMIR, **2013**;vol.1:73.

**Garay I.,** Vega L. y Ganado E. Curso básico sobre hipertensión. Tema 2. Antagonistas de los receptores de la angiotensina II. Revista Farmacia Profesional. **2017**;31:22-30.

**Ganga R,** Prem P, Suvarchala R. Antihypertensive effect of rutin: Pharmacological and computacional approach. Asian Journal of pharmaceutical and clinical research. **2019**;12:87-92.

**Garmendia F.** Factores metabólicos, endotelio y ateromatosis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Revista Academia Nacional de Medicina. **2014**;1:49-53.

**Galleano M,** Bernatova I, Puzserova A, Balis P, Sestakova N, Pechanova O, Fraga C. (-)-Epicatechin reduces blood pressure and improves vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats by NO-mediated mechanism. Journal International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life (IUBMB). **2013**;65:710-715.

**Gao C,** Cunningham D, Liu H, Khoo C, Gu L. Development of a thiolysis HPLC method for the analysis of procyanidins in cranberry products. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2018**;66:2159-2167.

**Gimenez S.** Angina de pecho. Revista farmacia profesional. **2004**;18:52-58.

**Hackfort B,** Mishra K. Emerging role of hydrogen sulfide-microRNA crosstalk in cardiovascular diseases. American Journal of physiology Heart and Circulatory Physiology. **2016**;310:H802–H812.

**Hernández J,** Herazo Y, Valero M. Frecuencia de factores de riesgo asociados a enfermedades cardiovasculares en población universitaria joven. Revista de Salud Pública. **2010**;12:852-864.

**Holubarsch C,** Colucci W, Eha J. 2018. Benefit-Risk Assessment of Crataegus Extract WS 1442: An Evidence-Based Review. American Journal of Cardiovascular Drugs. **2018**;18:25-36.

**Ibarra C,** Rojas A, Mendoza S, Bah M, Gutiérrez D, Hernández-Sandoval L. Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional



medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmaceutical Biology*. **2010**;48:732-739.

**INEGI** (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). Características de las defunciones registradas en México durante 2018. **2019**. [consultada el 19 de agosto del 2020]. Consultado en: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2019/EstSociodem/DefuncionesRegistradas2019.pdf>

**Isaza J**. Taninos o polifenoles vegetales. *Revista Scientia Et Technica*. **2007**;1:13-18.

**Jadráque M**, Coma I, González I, López J. Cardiopatía isquémica. Angina de pecho. Infarto de miocardio. 2ª edición. España. Ed. Ediciones NORMA. **1988**;vol1.

**Jaimes M**, Burgos R. Los antagonistas de los receptores de la angiotensina II a la luz de los estudios de mayor impacto. *Revista Médica La Paz*. **2009**;15:58-66.

**Kocyildiz Z**, Birman H, Olgac V, Akgun K, Meliko G, Mericli AH. Crataegus tanacetifolia leaf extract prevents L-NAME-induced hypertension in rats: a morphological study. *Phytotherapy Research*. **2006**;20:6-70.

**Kolodziej H**, Ferreira D, Roux D. Síntesis de taninos condensados. Parte 12. Acceso directo a [4,6] - y [4,8] - todos los derivados de 2,3-cis-procianidina de (-)-epicatequina: evaluación de las posiciones de enlace en análogos oligoméricos de Crataegus oxyacantha LJ Chem. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*. **1984**;1:343–350.

**Kumar D**, Arya V, Bhat Z, Khan N, Prasad D. The genus Crataegus: chemical and pharmacological perspectives. Brazilian Journal of Pharmacognosy. **2012**;22:1187-1200.

**Lahoz C**, Mostaza J. La aterosclerosis como enfermedad sistémica. Revista Española de Cardiología. **2007**;60:184-195.

**Liu P**, Yang B, Kallio H. Characterization of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. major) fruit by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. Journal Food Chemistry. **2010**;121:1188–1197.

**López D. 2019.** Evaluación de la actividad vasorrelajante de los extractos metanolicos 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 J.** Insuficiencia cardiaca: un enfoque multidisciplinar. San Vicente: Ed. Club Universitario. **2013**;vol1:9-10.

**López J**, de Torres F, García S. Guías y algoritmos de utilización de betabloqueantes en la practica clínica. Curso beta de actualización en betabloquenates. **2011**;137-143. Cardioteca.com.

**Martínez L.** y Mármol L. Curso básico sobre hipertensión. Tema 4. Betabloqueantes. Revista Farmacia Profesional. **2017**;31:20-25.

**Moreno P**, Portillo J. Isquemia miocárdica: conceptos básicos, diagnóstico e implicaciones clínicas. Segunda parte. Revista Colombiana de Cardiología. **2016**;23:461-582.

**Morr I**, García C. Los antagonistas del calcio en la hipertensión arterial. Revista Latinoamericana de Hipertensión. **2007**;2:59-64.

**Núñez C**, Hernández M. La problemática en la taxonomía de los recursos genéticos de tejocote (*Crataegus* spp.) en México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. **2011**;2:141-153

**Núñez C**, Nieto R, Barrientos A, Segura S, Sahagún J. y González F. Distribución y caracterización eco-climática del género *Crataegus* L. (Rosaceae, SUBFAM. Maloideae) en México. Revista Chapingo Serie Horticultura. **2008**;14:177-184.

**Onakpoya I**, Spencer E, Thompson M, Heneghan C. The effect of chlorogenic acid on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. Journal of Human Hypertension. **2015**;29:77-81.

**OMS** (Organización Mundial de la Salud). **2015**. Enfermedades cardiovasculares. [consultada el 22 de Julio del 2020]. Consultado en: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases\(cvds\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases(cvds))

**Olmedillo M**. Curso básico sobre hipertensión. Tema 5. Bloqueantes de los canales del calcio. Revista Farmacia profesional. **2017**;31:26-32.

**Padilla M**, Armas M, Hernández R. Uso de diuréticos en la hipertensión. Revista Latinoamericana de Hipertensión. **2006**;1:27-32.

**Piedra E**, Albarrán A, Rull J, Piñero D, Sosa V. Using multiple sources of characters to delimit species in the genus *Crataegus* (Rosaceae): the case of the *Crataegus rosei* complex. Journal Systematics and Biodiversity. **2016**;14:244-260.

**Pereira J**, Rincón G Niño D. Insuficiencia Cardíaca: Aspectos básicos de una epidemia en aumento. Revista Sociedad Cubana de Cardiología. **2016**;8: 58-70.

**Pérez M**, León J, Dueñas A, Alfonzo J, Navarro D, de la Noval R, et al. Guía cubana de diagnóstico, evaluación y tratamiento de la hipertensión arterial. Revista cubana médica. **2017**;56:242-321.

**Rosas M**, Borrayo G. Impacto de los nuevos criterios para diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial sistémica sugeridos por la American College of Cardiology/American Heart Association. Revista Gaceta Médica de México. **2018**;154:633-637.

**Ruiz M**. Factores de riesgo cardiovascular en niños y adolescentes. 1ra. Edición. Madrid: Editorial Díaz de Santos, **2004**;vol1:8.

**Salinas A**. Los betabloqueadores como primera opción del tratamiento en la hipertensión no complicada ¿posible o no?. Revista Finlay. **2011**;1: 61-65.

**Sánchez R**, Ayala M, Baglivo H, Velázquez C, Burlando G, Kohlmann O, Jiménez J, López J, Patricio B, Valdés G, Alcocer L, Bendersky M, Ramírez A, Zanchetti A. Guías Latinoamericanas de Hipertensión Arterial. Revista chilena de cardiología. **2010**;29:117-144.

**Shahat A**, Cos P, De Bruyne T, Apers S, Hammouda F, Ismail S, Vlietinck J. Actividad antiviral y antioxidante de flavonoides y proantocianidinas de Crataegus sinaica. Revista Planta Medica. **2002**;68:539-541.

**Silverthorn U**, Ober W., Garrison C. Fisiología Humana. Un enfoque integrado. 4ta edición. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, **2008**;vol1:508.

**Tarqui S.**, Flores Y. y Almanza G. Polyoxygenated flavonoids from *Baccharis pentlandii*. Revista Boliviana de Química. **2012**;29:10-14.

**Verma S**, Jain V, Verma D, Khamesra R. Crataegus oxyacantha- A cardioprotective herb. Journal of Herbal Medicine and Toxicology. **2007**;1:65-71.

**Wang J**, Xiong X, Feng B. Effect of Crataegus Usage in Cardiovascular Disease Prevention: An Evidence-Based Approach. Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. **2013**;2013:149363. doi: 10.1155/2013/149363

**Wang X**, Liu Y, Xiao L, Li L, Zhao X, Yang L, Chen N, Gao L, Zhang J. Hyperoside Protects Against Pressure Overload-Induced Cardiac Remodeling via the AKT Signaling Pathway. Journal of Cellular Physiology and Biochemistry. **2018**;51:827-841.

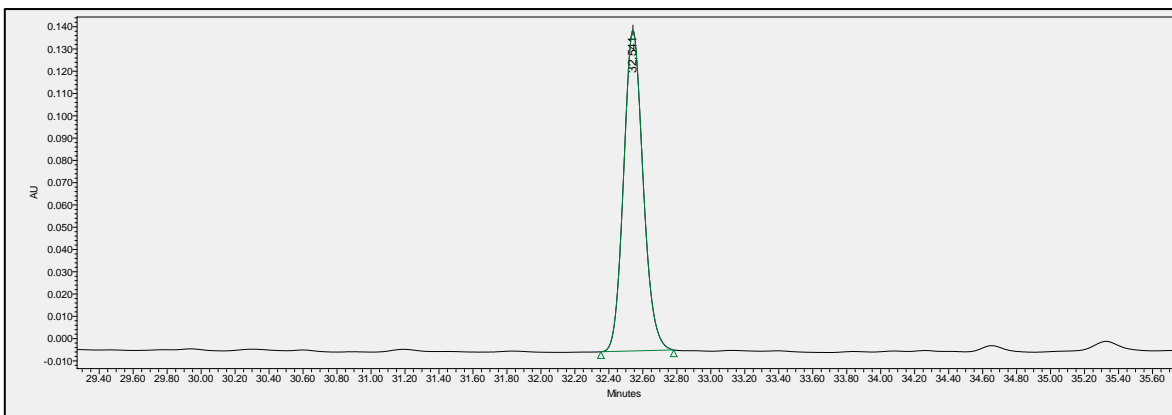
**Welsch U**. Histología. 2ª edición. Buenos Aires: Ed Medica Panamericana, **2008**;36.

**Zarrabeitia R**. **2015**. Epidemiología de la telangiectasia hemorrágica hereditaria en España: experiencia de la unidad especializada del hospital Sierrallana. Tesis doctoral. Universidad de Cantabria. Facultad de medicina.

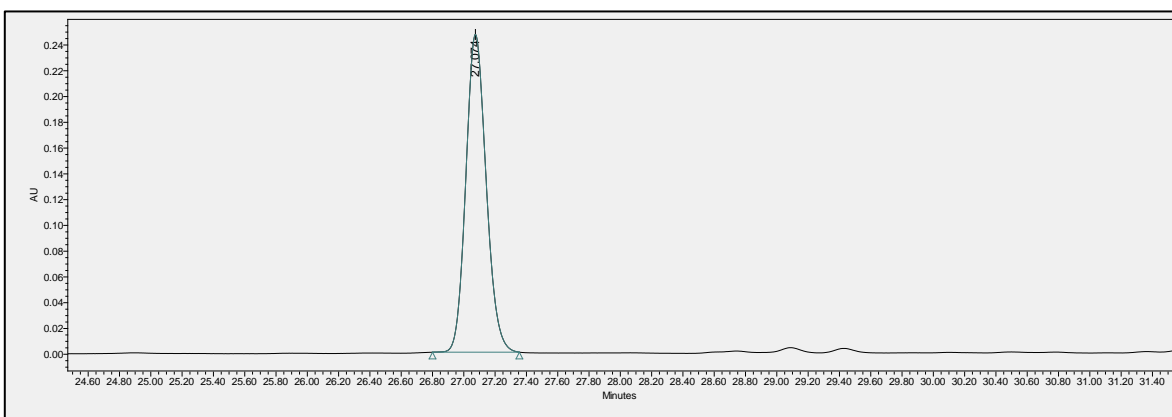
**Zhao Y**, Vanhoutte P, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. Journal of Pharmacological Sciences. **2015**;129:83-94.

## 9. ANEXOS

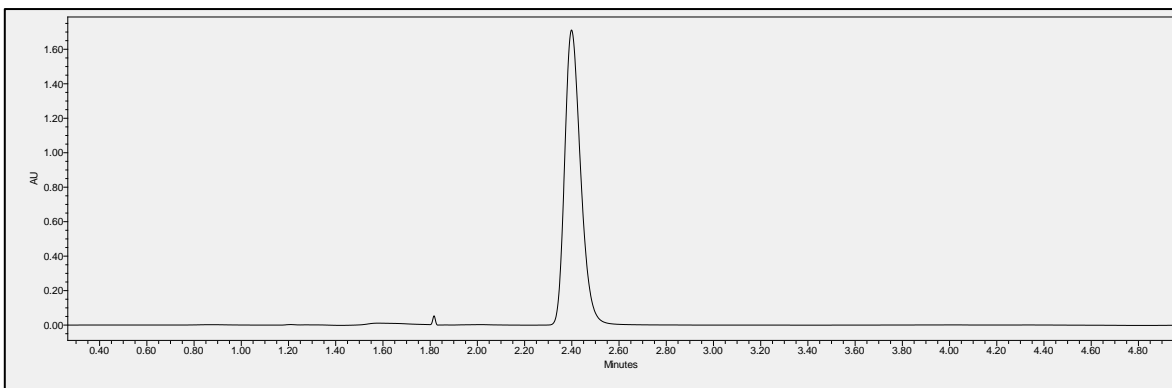
Contenido		
Anexo		Pagina
A-1	Cromatograma del estándar hesperitina	46
A-2	Cromatograma del estándar rutina	46
A-3	Cromatograma del estándar ácido cumárico	47
A-4	Cromatograma del estándar ácido caféico	47
A-5	Cromatograma del estándar genisteína	48
A-6	Cromatograma del estándar quercetina	48
A-7	Cromatograma del estándar catequina	49
A-8	Cromatograma del estándar apigenina	49
A-9	Cromatograma del estándar (-)-Epicatequina	50
A-10	Cromatograma del estándar vitexina	50
A-11	Comparación de los espectros UV-Vis para (-)-Epicatequina	51
A-12	Comparación de los espectros UV-Vis para el ácido caféico	51
A-13	Comparación de los espectros UV-Vis para la rutina	52
A-14	Curva de calibración para la rutina	52
A-15	Concentración de rutina calculada por regresión lineal	53
A-16	Regresión lineal para el cálculo de los parámetros de validación de la rutina	53
A-17	Parámetros de validación para la curva de calibración de la rutina.	53
A-18	Cálculo detallado de la concentración de la rutina en las hojas de <i>Crataegus rosei</i> .	55
A-19	Identificación en diversas especies del género <i>Crataegus</i> de los compuestos encontrados en la FT	55



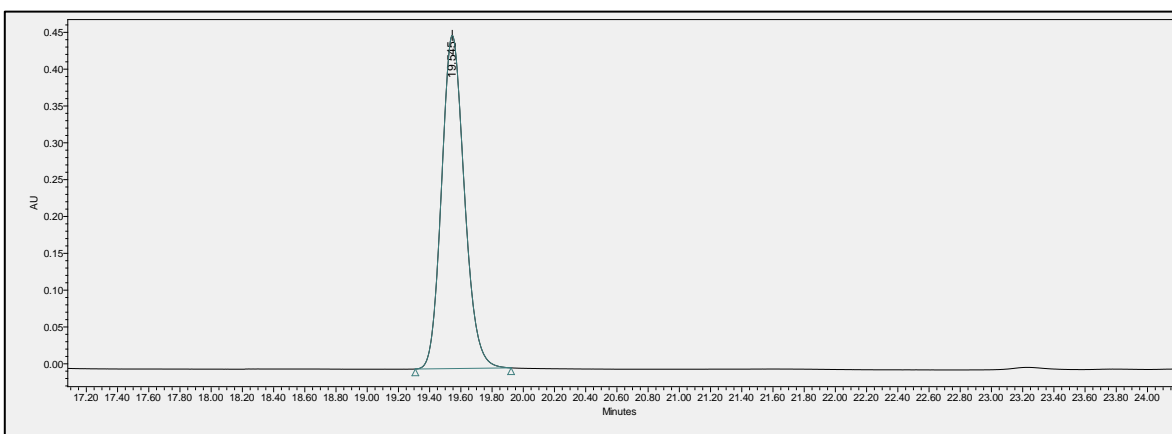
A-1. Cromatograma del estándar **hesperitina**: columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ ); gradiente H<sub>2</sub>O acidulada (999:1)-MeOH acidulado (999:1); flujo: 0.8 mL por min (280 nm); Rt: 32.541 min.



A-2. Cromatograma del estándar **rutina**: columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ ); gradiente H<sub>2</sub>O acidulada (999:1)-MeOH acidulado (999:1); flujo: 0.8 mL por min (280 nm); Rt: 27.064 min.

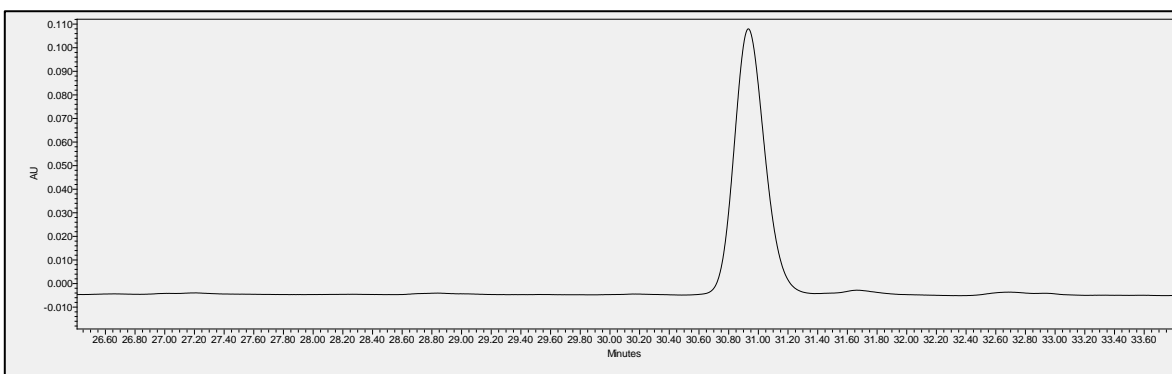


A-3. Cromatograma del estándar **ácido cumárico**: columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ ); gradiente H<sub>2</sub>O acidulada (999:1)-MeOH acidulado (999:1); flujo: 0.8 mL por min (280 nm).

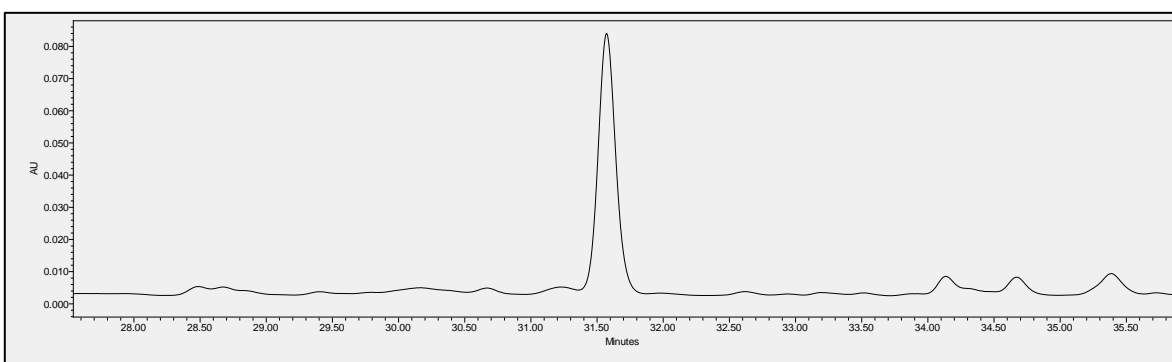


A-4. Cromatograma del estándar **ácido caféico**: columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ ); gradiente H<sub>2</sub>O acidulada (999:1)-MeOH acidulado (999:1); flujo: 0.8 mL por min (280 nm); Rt: 19.543 min.

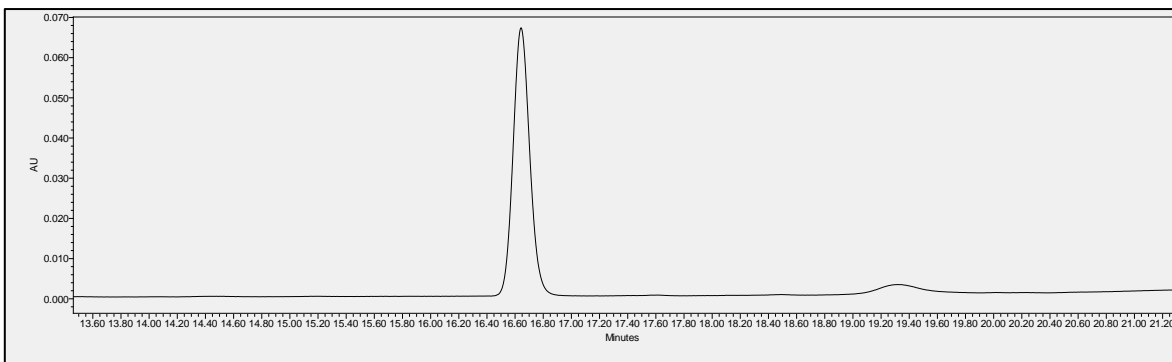




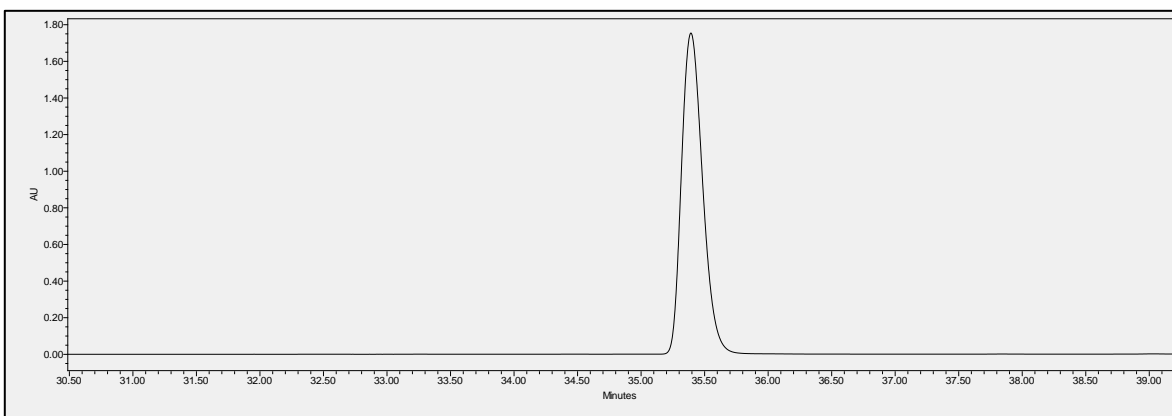
A-5. Cromatograma del estándar **genisteína**: columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ ); gradiente H<sub>2</sub>O acidulada (999:1)-MeOH acidulado (999:1); flujo: 0.8 mL por min (280 nm).



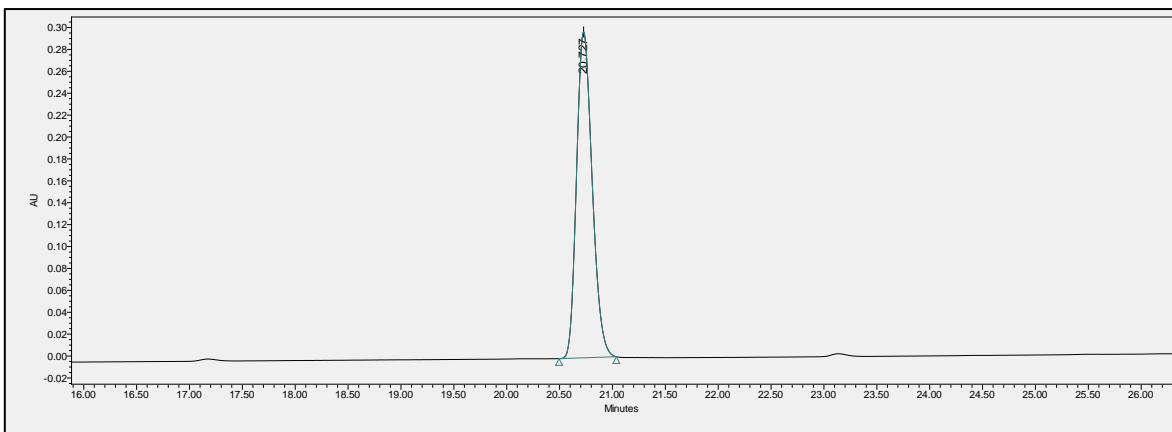
A-6. Cromatograma del estándar **quercetina**: columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ ); gradiente H<sub>2</sub>O acidulada (999:1)-MeOH acidulado (999:1); flujo: 0.8 mL por min (280 nm).



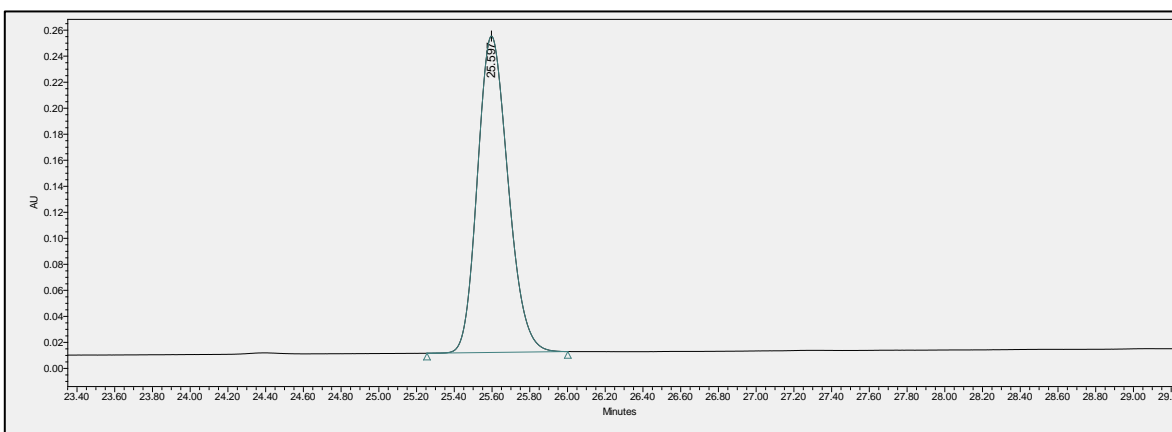
A-7. Cromatograma del estándar **catequina**: columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ ); gradiente H<sub>2</sub>O acidulada (999:1)-MeOH acidulado (999:1); flujo: 0.8 mL por min (280 nm).



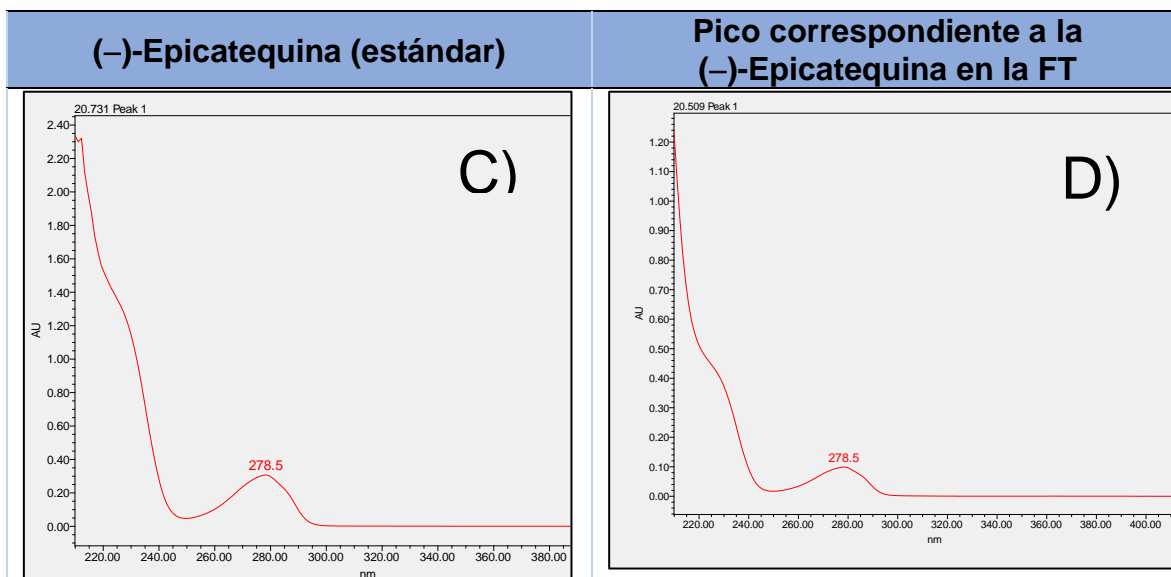
A-8. Cromatograma del estándar **apigenina**: columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ ); gradiente H<sub>2</sub>O acidulada (999:1)-MeOH acidulado (999:1); flujo: 0.8 mL por min (280 nm).



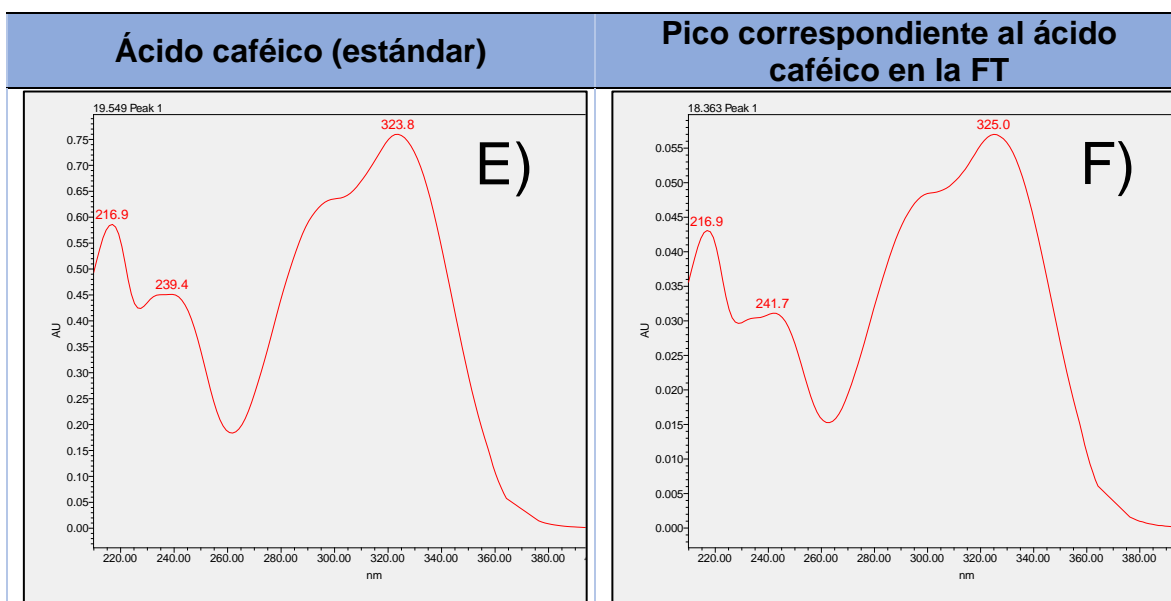
A-9. Cromatograma del estándar **(-)-Epicatequina**: columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ ); gradiente H<sub>2</sub>O acidulada (999:1)-MeOH acidulado (999:1); flujo: 0.8 mL por min (280 nm).



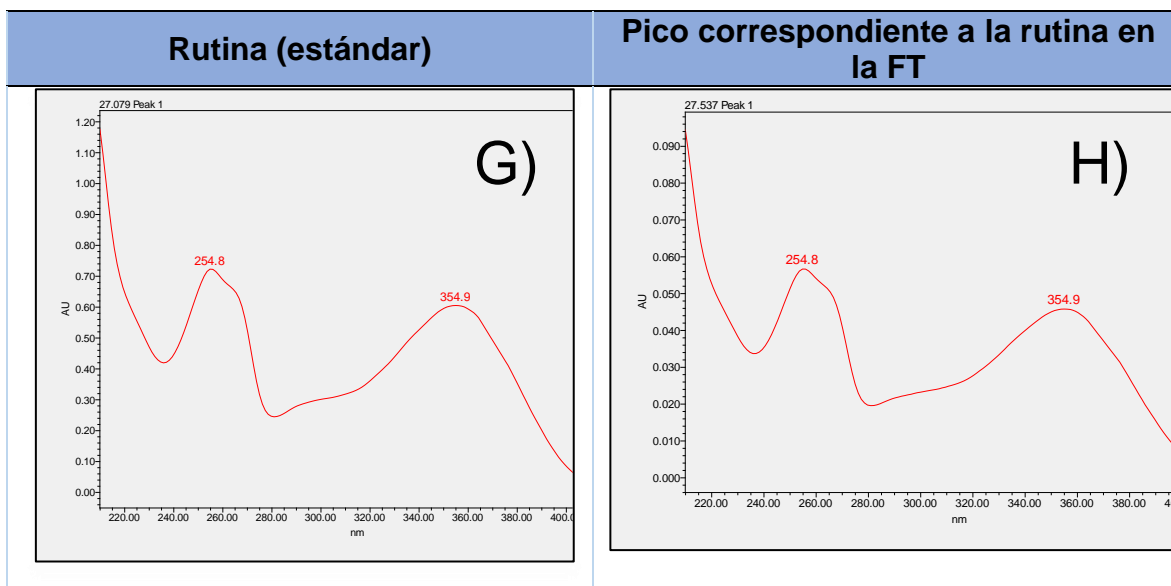
A-10. Cromatograma del estándar **vitexina**: columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ ); gradiente H<sub>2</sub>O acidulada (999:1)-MeOH acidulado (999:1); flujo: 0.8 mL por min (280 nm); Rt: 25.597 min.



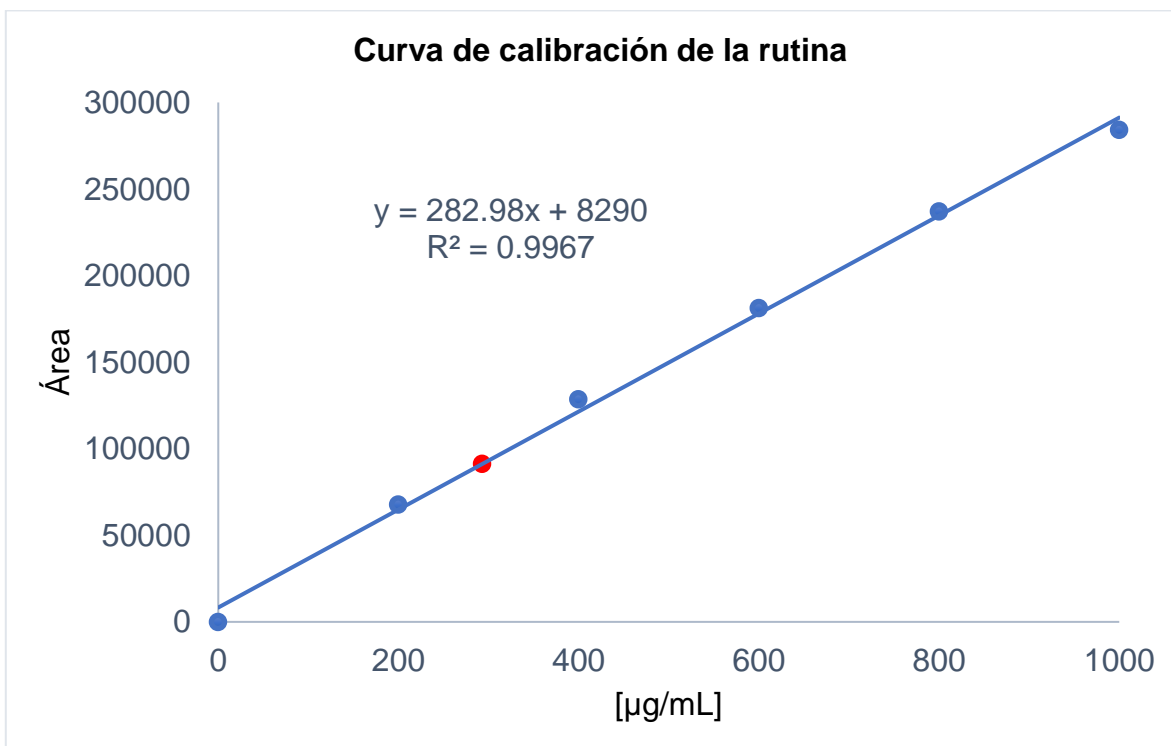
A-11. Comparación de los espectros UV-Vis para (-)-Epicatequina. C) espectro UV-Vis del estándar (-)-Epicatequina; D) espectro UV-Vis del pico con Rt de 20.50 en la FT.



A-12. Comparación de los espectros UV-Vis para el ácido caféico. E) espectro UV-Vis del estándar ácido caféico; F) espectro UV-Vis del pico con Rt de 18.36 en la FT.



A-13. Comparación de los espectros UV-Vis para la rutina. G) espectro UV-Vis del estándar rutina; H) espectro UV-Vis del pico con Rt de 27.53 en la FT.



A-14. Curva de calibración para la rutina. El punto rojo que entra dentro de la curva representa al pico correspondiente a la rutina en la FT.

A-15. Concentración de rutina calculada por regresión lineal.

[FT]	Área experimental. Pico con Rt 27.53 min	[rutina] calculada
30 mg/1 mL	91200	292.988 µg/mL de solución de FT

A-16. Regresión lineal para el cálculo de los parámetros de validación de la rutina.

x	y	$y^{\wedge} = 282.98x + 8290$		
[rutina]	Área	$y^{\wedge}$	$y^{\wedge} - y$	$(y^{\wedge} - y)^2$
0	0	8290.3	8290.3	68729074.1
200	67804	64886.3	-2917.7	8512973.29
400	128490	121482.3	-7007.7	49107859.3
600	181305	178078.3	-3226.7	10411592.9
800	236995	234674.3	-2320.7	5385648.49
1000	284100	291270.3	7170.3	51413202.1

Tabla A-17. Parámetros de validación para la curva de calibración de la rutina.

Parámetro	Fórmula	Valor calculado
$S_{x/y}$	$\sqrt{\frac{\sum(y^{\wedge} - y)^2}{n - 2}}$ <p>(Gao y col.,2018) Donde n es el # de concentraciones utilizadas para construir la curva.</p>	5679.79
LD	$\frac{S_{x/y} * 3}{m}$ <p>(Gao y col.,2018) Donde m es la pendiente.</p>	60.21
LQ	$\frac{S_{x/y} * 5}{m}$ <p>(Gao y col.,2018) Donde m es la pendiente.</p>	96.67

A-18. Cálculo detallado de la concentración de la rutina en las hojas de *Crataegus rosei*.

$$[1 \text{ mL sol de FT}] \left[ 293 \frac{\mu\text{g de rutina}}{\text{mL}} \right] = 293 \mu\text{g de rutina en } 30 \text{ mg de FT}$$

$$\left[ \frac{293 \mu\text{g de rutina}}{30 \text{ mg}} \right] = 9.76 \mu\text{g de rutina/mg de FT}$$

$$0.337 \text{ g de FT} \left[ \frac{9.76 \text{ mg de rutina}}{1 \text{ g de FT}} \right] = 3.28 \text{ mg de rutina}$$

$$\left[ \frac{3.28 \text{ mg de rutina}}{30 \text{ g de EM}} \right] = 0.109 \frac{\text{mg de rutina}}{\text{g de EM}}$$

$$1 \text{ g de hojas de } C. \text{ rosei} \left[ \frac{304 \text{ g de EM}}{1923 \text{ g de hojas de } C. \text{ rosei}} \right] = 0.158 \text{ g de EM}$$

$$0.158 \text{ g de EM} \left[ \frac{0.109 \text{ mg de rutina}}{1 \text{ g de EM}} \right] = 0.0172 \text{ mg de rutina}$$

$$0.158 \frac{\text{g de EM}}{\text{g de hoja de } C. \text{ rosei}} \left[ \frac{0.0172 \text{ mg de rutina}}{1 \text{ g de EM}} \right] = 0.00271 \frac{\text{mg de rutina}}{\text{g de hoja de } C. \text{ rosei}}$$

$$0.00271 \frac{\text{mg de rutina}}{\text{g de hoja de } C. \text{ rosei}} \left[ \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} \right]$$

$$= 2.717 \text{ mg de rutina por cada kg de hoja de } C. \text{ rosei}$$

A-19. Identificación en diversas especies del género *Crataegus* de los compuestos encontrados en la FT.

Compuesto	Especie de <i>Crataegus</i>	Referencia
(-)-Epicatequina	<i>Crataegus oxyacantha</i>	Kolodziej y col., 1984
	<i>Crataegus pinnatifida</i> var. <i>major</i>	Liu y col., 2010
	<i>Crataegus sinaica</i>	Shahat y col., 2002
	<i>Crataegus scabrifolia</i>	Edwards y col., 2012
	<i>Crataegus azarolus</i> var. <i>Aronia</i>	
	<i>Crataegus monogyna</i>	
Quercetina	<i>Crataegus laevigata</i>	Edwards y col., 2012
	<i>Crataegus cuneata</i>	
	<i>Crataegus germanica</i>	

	<i>Crataegus azarolus</i> var. <i>aronia</i>	
	<i>Crataegus microphyla</i>	
	<i>Crataegus monogyna</i>	
	<i>Crataegus pinnatifida</i> var. <i>major</i>	
	<i>Crataegus scabrifolia</i>	
<b>Ácido clorogénico</b>	<i>Crataegus pinnatifida</i> var. <i>major</i>	Liu y col., 2010
	<i>Crataegus monogyna</i>	Bahorun y col., 2003
	<i>Crataegus germanica</i>	Edwards y col., 2012
<b>Vitexina</b>	<i>Crataegus cuneata</i>	Edwards y col., 2012
	<i>Crataegus hupehensis</i>	
	<i>Crataegus laevigata</i>	
	<i>Crataegus monogyna</i>	
	<i>Crataegus microphyla</i>	
	<i>Crataegus pentagyna</i>	
	<i>Crataegus scabrifolia</i>	
	<i>Crataegus maximowiczii</i>	
<b>Hiperósido</b>	<i>Crataegus pinnatifida</i> var. <i>major</i>	Liu y col., 2010
	<i>Crataegus monogyna</i>	Bahorun y col., 2003
	<i>Crataegus cuneata</i>	Edwards y col., 2012
	<i>Crataegus aronia</i> var. <i>aronia</i>	
	<i>Crataegus brettschneideri</i>	
	<i>Crataegus hupehensis</i>	
	<i>Crataegus laevigata</i>	
	<i>Crataegus microphyla</i>	
	<i>Crataegus pentagyna</i>	
	<i>Crataegus scabrifolia</i>	
<b>Rutina</b>	<i>Crataegus xmacrocarpa</i>	Edwards y col., 2012
	<i>Crataegus azarolus</i> var. <i>aronia</i>	
	<i>Crataegus cuneata</i>	
	<i>Crataegus hupehensis</i>	
	<i>Crataegus kansuensis</i>	
	<i>Crataegus laevigata</i>	
	<i>Crataegus monogyna</i>	
	<i>Crataegus scabrifolia</i>	
<i>Crataegus anguinea</i>		