

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

**“CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL EXTRACTO DE
DICLOROMETANO DE LA RAÍZ DE *Heliopsis longipes* Y
EVALUACIÓN DEL EFECTO VASODILATADOR DE LOS
COMPUESTOS MAYORITARIOS PRESENTES EN EL EXTRACTO”**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. GABRIELA VICTORIA RUIZ CASTILLO

DIRIGIDA POR:

Dra. MARÍA ALEJANDRA ROJAS MOLINA

**QUERÉTARO
AGOSTO DE 2021
MÉXICO**



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

“CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL EXTRACTO DE DICLOROMETANO DE LA RAÍZ
DE *Heliopsis longipes* Y EVALUACIÓN DEL EFECTO VASODILATADOR DE LOS
COMPUESTOS MAYORITARIOS PRESENTES EN EL EXTRACTO”

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. GABRIELA VICTORIA RUIZ CASTILLO

DIRIGIDA POR:

Dra. MARÍA ALEJANDRA ROJAS MOLINA

COMITÉ TUTORAL

Dra. María Alejandra Rojas Molina

Presidente

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Secretario

Dr. Francisco Javier Luna Vázquez

Vocal

Dr. César Ibarra Alvarado

Suplente

Dra. Juana Isela Rojas Molina

Suplente

Centro Universitario
Santiago de Querétaro
Agosto de 2021

“La necesidad de ver el horizonte, de ver un poco más allá,
es lo que nos salva. Y creo que está en todos nosotros”

Luis Eduardo Aute

Dirección General de Bibliotecas UAQ

*Este trabajo va dedicado a todos los que hemos perdido
en esta pandemia Covid-19, y no vamos a olvidar.*

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Químicas y al Posgrado en Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Querétaro, por la infraestructura y formación académica otorgada en mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca de manutención “número 100211” otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría de la Universidad Autónoma de Querétaro, por el apoyo económico otorgado a través del proyecto “FOPER-2020-FQU02238” para la conclusión en tiempo y forma de este proyecto de maestría.

A CONACyT por el apoyo recibido a través del proyecto 316849 del Fondo de Desarrollo Científico 2 (FOP02-2021-04).

Al Dr. Pedro Vázquez Landaverde del Centro de Investigación en Ciencias Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional (CICATA), por su colaboración para la realización del análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Agradezco su disposición para lograr los objetivos finales de este proyecto, por su apoyo y su compromiso en el proyecto.

A la Dra. Alejandra Rojas, por recibirme en su grupo de trabajo y por permitirme formar parte de este proyecto de investigación. Gracias por su dedicación y paciencia. Toda mi admiración y agradecimiento por la oportunidad brindada.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Moustapha Bah, Dr. Francisco Luna, Dr. César Ibarra y a la Dra. Isela Rojas, por sus acertados cuestionamientos, evaluaciones y sus valiosas aportaciones al proyecto. Les agradezco el tiempo dedicado y la formación recibida durante mis años de maestría.

A los integrantes de los diferentes laboratorios del posgrado y en especial al Dr. Francisco Luna y a la Dra. Leticia García, que participaron en el desarrollo del proyecto. Les agradezco su apoyo, compromiso y buena actitud.

A la familia Soto-Hernández, por recibirme y abrirme las puertas de su casa y de su corazón. Les agradezco por brindarme ese calor de hogar y hacerme sentir como en casa. Les estoy eternamente agradecida.

A Jazmín Soto, mi compañera y amiga. Estoy infinitamente agradecida contigo por permitirme ser parte de tu vida y de tu familia. Eres una persona que ilumina por dónde pasa, que siempre tiene esa sonrisa y mirada de complicidad que todo soluciona. Eres luz, que nunca se te olvide y nunca te apagues.

A todos mis amigos que, a pesar de la distancia, el tiempo y las dificultades siempre están presentes. Gracias por su apoyo y por hacer esto más divertido.

A toda mi familia, por seguir de cerca mi camino y velar por mi formación personal y académica. A mis padres, por su amor, trabajo y sacrificio; este logro es suyo.

Y finalmente, a quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento y un pedacito de su vida.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Enfermedades crónicas no transmisibles	3
2.2. Hipertensión arterial	4
2.3. Tratamiento de la hipertensión arterial	7
2.3.1. Antagonistas α_1 adrenérgicos	7
2.3.2. Antagonistas β adrenérgicos	8
2.3.3. Antagonistas de los receptores AT ₁	8
2.3.4. Bloqueadores de canales de calcio tipo L.....	9
2.3.5. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina	10
2.3.6. Diuréticos	10
2.3.7. Otros vasodilatadores.....	11
2.3.8. Desventajas de los antihipertensivos disponibles	12
2.4. Medicina tradicional.....	12
2.5. Productos naturales como fuente de moléculas bioactivas	14
2.6. Biodiversidad en México	15
2.7. Familia Asteraceae.....	16
2.8. Género <i>Heliopsis</i>	17
2.9. <i>Heliopsis longipes</i>	19
2.9.1. Estudios fitoquímicos realizados sobre <i>H. longipes</i>	20
2.9.2. Estudios farmacológicos realizados sobre <i>H. longipes</i>	22
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	26
5. HIPÓTESIS.....	26
6. OBJETIVOS	27
6.1. OBJETIVO GENERAL.....	27
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	28
8. MATERIALES Y MÉTODOS	29
8.1. Obtención del extracto total de la raíz de <i>Heliopsis longipes</i>	29
8.2. Análisis del extracto de diclorometano mediante CG-MS.....	29

8.3. Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios mediante CCA.....	30
8.4. Evaluación farmacológica	31
8.4.1 Modelo experimental	31
8.4.2. Ensayo <i>ex vivo</i> de aorta aislada de rata	31
8.5. Análisis estadístico.....	32
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
9.1. Identificación de compuestos volátiles mediante CG-MS.....	33
9.2. Caracterización química preliminar de los compuestos purificados de la fracción FAB1	36
9.3. Caracterización química de los compuestos purificados	38
9.4. Evaluación del efecto vasodilatador de los compuestos mayoritarios identificados del extracto de diclorometano de la raíz de <i>H. longipes</i>	39
10. CONCLUSIONES.....	43
11. PERSPECTIVAS.....	44
12. REFERENCIAS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Compuestos aislados a partir de especies del género <i>Heliopsis</i>	27
Figura 2.	Características morfológicas de <i>Heliopsis longipes</i> . a) ejemplar completo, b) inflorescencia, c) raíces y d) tallos y hojas de la especie vegetal.....	29
Figura 3.	Compuestos aislados de <i>Heliopsis longipes</i>	31
Figura 4.	Diseño experimental.....	36
Figura 5.	Análisis cromatográfico de la fracción F72 por CCF uni y bidimensional.....	45
Figura 6.	Análisis cromatográfico comparativo de la fracción F72 con estándares de triterpenos.....	46
Figura 7.	Curva concentración-respuesta del efecto vasodilatador de los compuestos mayoritarios identificados por CG-MS.....	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Compuestos identificados en el extracto de diclorometano de la raíz de <i>H. longipes</i> mediante CG-MS.....	40
Cuadro 2.	Fracciones y grupos obtenidos del fraccionamiento cromatográfico de la fracción FAB1 mediante CCA.....	42
Cuadro 3.	Compuestos purificados mediante CCA de la fracción FAB1.	46
Cuadro 4.	Efecto vasodilatador de los compuestos identificados en el extracto de diclorometano de <i>H. longipes</i>	52

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ACRÓNIMOS

AB	Ácido Betulínico
AC	Adenilato Ciclasa
AC	Ácido Corosólico
AMPc	Adenosín Monofosfato Cíclico
AO	Ácido Oleanólico
AU	Ácido Ursólico
AVAD	Años Ajustados por Discapacidad
CCA	Cromatografía en Columna Abierta
CCBs	Bloqueadores de los Canales de Calcio
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CE₅₀	Concentración Efectiva Media
CG/MS	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
DAG	Diacilglicerol
DL₅₀	Dosis Letal Media
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
ECNT	Enfermedades Crónicas No Transmisibles
ECV	Enfermedades Cardiovasculares
EDMHI	Extracto de diclorometano de <i>Heliopsis longipes</i>
ES	Escualeno
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos)
HS-SPM	Microextracción en Fase Sólida con Espacio de Cabeza
HTA	Hipertensión Arterial
HTS	Cribado de Alto Rendimiento

IECA	Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina
IP₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
K_{ATP}	Canales de Potasio dependientes de ATP
Kpc	Kilogramo de Peso Corporal
LU	Lupeol
MLC	Cadena Ligera de Miosina
MLCK	Cinasa de la Cadena Ligera de Miosina
mmHg	Milímetros de Mercurio
MT	Medicina Tradicional
NEQ	Nuevas Entidades Químicas
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PIP₂	Fosfatidilinositol-4,5-difosfato
PKA	Proteína Cinasa dependiente de AMPc
PLB	Fosfolamban
PLC	Fosfolipasa C
PN	Productos Naturales
RIP₃	Receptor Sensible a IP ₃
RS	Retículo Sarcoplásmico
RyR	Receptor de Rianodina
SEM	Error Estándar de la Media
SERCA	ATPasa de calcio del retículo Sarcoplásmico
UPLC-MS/QTOF	Cromatografía Líquida de Ultra-resolución acoplada a Espectrometría de Masas con cuadrupolo de Tiempo de Vuelo
UV	Uvaol

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación 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.

RESUMEN

Las enfermedades crónicas no transmisibles representan uno de los mayores desafíos a nivel mundial, debido a su alta prevalencia e incidencia en edades cada vez más tempranas. Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo y representan más del 80 % de la mortalidad a nivel global. De manera particular, la hipertensión es la principal causa de muertes prematuras y se considera como el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares y daño renal. A pesar de ser el principal factor de riesgo, esta afección puede prevenirse y su aparición puede retrasarse por medio de conductas saludables y un adecuado tratamiento farmacológico. Sin embargo, los fármacos antihipertensivos utilizados a la fecha presentan una limitada eficacia, diversos efectos adversos y su uso se encuentra restringido, cuando se presentan enfermedades concomitantes. Por lo tanto, la búsqueda de medicamentos antihipertensivos más eficaces representa una necesidad y uno de los mayores desafíos médicos. Estudios recientes, realizados por nuestro grupo de trabajo, demostraron que el extracto de diclorometano de la raíz de *Heliopsis longipes*, así como la afinina, su componente mayoritario, inducen un significativo efecto vasodilatador en aorta aislada de rata. Con base en estos resultados, consideramos que la especie vegetal *H. longipes* es una buena candidata para la búsqueda de moléculas con efecto vasodilatador. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivos principales: 1) realizar un estudio químico del extracto de diclorometano de la raíz de *H. longipes*, a fin de identificar y caracterizar el mayor número posible de compuestos volátiles presentes en esta raíz, mediante el uso de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) y 2) evaluar el efecto vasodilatador de los compuestos identificados, cuyo efecto vasodilatador no había sido reportado, los cuales podrían representar prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos fármacos antihipertensivos y/o ser utilizados como marcadores químicos para el desarrollo de fitomedicamentos preparados a partir de esta raíz. El análisis cromatográfico, mediante CG-MS, permitió identificar como compuestos mayoritarios a la afinina (46.1 %), la *N*-2-metilbutil-2E,6Z,8E-decatrienamida (7.75 %), al ácido adípico (0.47 %) y el escualeno (0.46 %). Tanto el ácido adípico ($E_{max} = 100 \pm 1.8 \%$; $CE_{50} = 451.10 \pm 11.12 \mu\text{g/mL}$), como el escualeno (E_{max} de $61.58 \pm 3.98 \%$; $CE_{50} = 47.10 \pm 5.44 \mu\text{g/mL}$) indujeron una vasodilatación significativa. Considerando la abundancia relativa y su efecto vasodilatador, resulta factible hipotetizar que ambos compuestos contribuyen, de manera significativa, al efecto vasodilatador del extracto orgánico total de *H. longipes*.

Palabras clave: *Heliopsis longipes*, raíz, phytochemical study, CG-MS, vasodilatación, aorta de rata.

ABSTRACT

Chronic non-communicable diseases represent one of the greatest challenges worldwide, due to their high prevalence and incidence at increasingly younger ages. Cardiovascular diseases are the main cause of death in the world and represent more than 80% of mortality globally. In particular, hypertension is the main cause of premature death and is considered the main risk factor for the development of cardiovascular diseases, strokes and kidney damage. Despite being the main risk factor, this condition can be prevented and its appearance can be delayed through healthy behaviors and adequate pharmacological treatment. However, the antihypertensive drugs used to date have limited efficacy, various adverse effects, and their use is restricted when concomitant diseases occur. Therefore, the search for more effective antihypertensive drugs represents a necessity and one of the greatest medical challenges. Recent studies, carried out by our working group, showed that the dichloromethane extract from the root of *Heliopsis longipes*, as well as affinin, its main component, induce a significant vasodilator effect in isolated rat aorta. Based on these results, we consider that *H. longipes* is a good candidate in the search for molecules with vasodilator effect. In this context, the main objectives of the present study were: 1) carry out a chemical study of the dichloromethane extract from the root of *H. longipes* in order to identify and characterize by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) the largest possible number of volatile compounds present in this root and 2) to assess the vasodilator effect of the compounds identified by the chromatographic analysis, whose vasodilator effect had not been previously reported, which could represent structural prototypes for the development of new antihypertensive drugs and/or chemical markers for the development of phytomedicines prepared from this root. GC-MS analysis allowed identification of affinin (46.1 %), *N*-2-methylbutyl-2E, 6Z, 8E-decatrienamamide (7.75 %), adipic acid (0.47 %) and squalene (0.46 % area) as the major non-polar compounds. Adipic acid ($E_{\max} = 100 \pm 1.8 \%$; $EC_{50} = 451.10 \pm 11.12 \mu\text{g/mL}$) and squalene ($E_{\max} = 61.58 \pm 3.98 \%$; $EC_{50} = 47.10 \pm 5.44 \mu\text{g/mL}$) induced a significant vasodilation. Considering their relative abundance and their vasodilator effect, it is likely to hypothesize that these compounds could contribute to the vasodilator effect of the crude organic extract of *H. longipes* roots.

Keywords: *Heliopsis longipes*, roots, phytochemical study, vasodilation, rat aorta.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles son un grupo heterogéneo de padecimientos de larga duración, que resultan de la combinación de factores genéticos, fisiológicos, ambientales y conductuales, que causan la muerte de 41 millones de personas anuales a nivel mundial. Las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de defunción en todo el mundo y representan más del 80 % de las muertes prematuras por enfermedades crónicas no transmisibles (Cordova-Villalobos *et al.*, 2008; Barba, 2018).

La hipertensión arterial es considerada como uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, tales como accidentes cerebrovasculares y falla renal, así mismo, se encuentra dentro de las primeras causas de muerte a nivel mundial; por lo tanto, ha representado uno de los retos más grandes para los sistemas de salud en los últimos años (Forouzanfar *et al.*, 2017; Barba, 2018). Sin embargo, a pesar de ser el principal factor de riesgo, el desarrollo de la hipertensión arterial es modificable, prevenible y su aparición puede ser retardada con la disminución de los factores de riesgo conductuales, el control de enfermedades concomitantes y la terapia farmacológica (OMS, 2013a).

A pesar del conjunto de fármacos antihipertensivos disponibles en la actualidad, su baja eficacia, la presencia de efectos secundarios y sus limitaciones en la presencia de patologías concomitantes (síndrome metabólico), conlleva a la necesidad de administrar varios fármacos en forma simultánea, lo cual genera la falta de adherencia al tratamiento y/o intolerancia por parte de los pacientes. La búsqueda de fármacos antihipertensivos más eficaces sigue siendo una de las mayores necesidades y desafíos médicos (FDA, 2011; OMS, 2013b; Rosas-Peralta *et al.*, 2016).

De acuerdo a datos de la OMS, se estima que el 80 % de la población mundial utiliza la medicina tradicional para complementar sus necesidades básicas de salud, representando la principal y, en ocasiones, la única fuente de atención primaria. Entre los principales recursos que ofrecen los sistemas médicos tradicionales se encuentran las plantas, las cuales son empleadas para el tratamiento de un amplio

número de enfermedades, principalmente afecciones crónicas no transmisibles. Sin embargo, a pesar de su extenso uso a través del tiempo, la información disponible con respecto a su inocuidad y eficacia dista mucho de ser suficiente para satisfacer los criterios necesarios para su utilización e integración a los servicios de salud. Por lo tanto, resulta evidente la necesidad de llevar a cabo estudios científicos contundentes para validar el uso tradicional de las plantas empleadas en la medicina tradicional. La información etnomédica documentada sobre su utilización constituye un excelente punto de partida para la elección de plantas candidatas para la búsqueda de nuevas entidades químicas que puedan servir como prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos medicamentos (OMS, 2013a). Se estima que en México alrededor de 4,000 especies de plantas son utilizadas con fines medicinales, de las cuales solo el 5 % han sido estudiadas con un enfoque científico (Ocegueda *et al.*, 2005).

Heliopsis longipes es una planta perenne perteneciente a la familia Asteraceae, endémica de la Sierra Gorda que colinda entre los estados de San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro. Esta especie vegetal es ampliamente utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento del dolor de muelas, gingivitis y dolor muscular (Cilia-López *et al.*, 2013). Dado su empleo en la medicina tradicional y, considerando un criterio quimiotaconómico, se ha evaluado la actividad farmacológica de extractos preparados a partir de la raíz y de su componente mayoritario en diversos modelos farmacológicos, dirigidos principalmente hacia la determinación de su capacidad analgésica (Cariño-Cortés *et al.*, 2010; Cilia-López *et al.*, 2010) y antimicrobiana (Gutiérrez-Lugo *et al.*, 1996; Ramírez-Chávez *et al.*, 2000). Estudios recientes, realizados por nuestro grupo de investigación, demostraron que el extracto de diclorometano de la raíz de *H. longipes*, así como de la afinina, su componente mayoritario, inducen un significativo efecto vasodilatador (Castro-Ruiz *et al.*, 2017). En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo realizar un estudio químico del extracto de diclorometano de la raíz de *H. longipes* para determinar si dicha planta contiene, además de la afinina, otros compuestos vasodilatadores que pudieran representar prototipos estructurales útiles para el desarrollo de nuevos fármacos antihipertensivos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Enfermedades crónicas no transmisibles

Las enfermedades crónicas no transmisibles (**ECNT**) son unos de los retos más grandes que enfrentan los sistemas de salud a nivel mundial, debido a su alta prevalencia, su creciente contribución a la mortalidad y su incidencia en edades cada vez más tempranas, además de ser la causa más frecuente de incapacidad prematura y el costo elevado de su tratamiento. Las ECNT son un grupo heterogéneo de padecimientos de larga duración que resultan de la combinación de factores genéticos, fisiológicos, ambientales y conductuales que causan la muerte de 41 millones de personas en el mundo cada año (71 % de las muertes en el mundo) (Córdova-Villalobos *et al.*, 2008; Barba, 2018).

Dentro del grupo de ECNT, las enfermedades cardiovasculares (**ECV**) constituyen la principal causa de defunción en todo el mundo (17,9 millones anuales), seguidas del cáncer (9,0 millones), las enfermedades respiratorias (3,9 millones) y la diabetes (1,6 millones). De hecho, en conjunto, las patologías cardiovasculares representan más del 80 % de las muertes prematuras por ECNT (OPS, 2019).

La Organización Mundial de la Salud (**OMS**) define a las ECV como un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos, entre las que destacan las cardiopatías coronarias, las enfermedades cerebrovasculares, la hipertensión arterial, la vasculopatía periférica, la insuficiencia cardíaca y las cardiopatías reumáticas y congénitas. Los principales factores de riesgo para desarrollar una ECV son la hipertensión arterial, la hiperlipidemia, la resistencia a la insulina, el estilo de vida y una predisposición hereditaria (OPS, 2019).

La hipertensión arterial (**HTA**) se encuentra dentro de las primeras causas de muerte a nivel mundial; se estima que las complicaciones de la hipertensión causan 9.4 millones de muertes anuales y es la causa de al menos 45 % de las muertes por cardiopatías y el 51 % de las muertes por accidente cerebrovascular. Además, la HTA representa el mayor factor de riesgo relacionado a los años por discapacidad

(AVAD), ya que la muerte prematura, la discapacidad, la pérdida de ingresos y los gastos médicos ocasionados por esta enfermedad repercuten en las familias, las comunidades y las finanzas nacionales (OMS, 2013b).

México se encuentra dentro de los países con mayor prevalencia en ECNT. En 2018, el 10.3 % de la población adulta vivía con diabetes, el 31.5 % con hipertensión arterial y el 36.8 % con síndrome metabólico. Estos escenarios, se asocian a una mayor probabilidad de desarrollar ECV y representan una importante desventaja frente a la tasa de morbimortalidad mundial. En este contexto, se prevé que, en 2050, las comorbilidades asociadas a la hipertensión incrementen de manera significativa la mortalidad por EVC en México (Barba, 2018; SSA, 2018).

El desarrollo de patologías cardiovasculares se encuentra asociada principalmente a la pérdida de calidad de vida, discapacidad y mortalidad. Sin embargo, estudios epidemiológicos realizados durante las epidemias de gripe de los virus H1N1, SARS-CoV-2 y MERS-CoV señalaron que la hipertensión y las ECV incrementan la gravedad de la infección por estos virus, además de adquirir mayor riesgo de infecciones bacterianas secundarias, complicaciones respiratorias con graves consecuencias y mortalidad por infarto (Ferrari *et al.*, 2020).

2.2. Hipertensión arterial

La HTA es definida por la OMS como un trastorno en el que los vasos sanguíneos poseen una tensión persistentemente alta (≥ 140 mmHg sistólica/ ≥ 90 mmHg diastólica), generada por un desequilibrio en la regulación de los factores vasoactivos que regulan el tono vascular. Se estima que un incremento de 10 mmHg en la tensión arterial sistólica por encima de 110 mmHg, duplica el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y una reducción de 5 mmHg disminuirá hasta el 14 % la mortalidad debida a infarto y 9 % la mortalidad por enfermedad coronaria (OMS, 2013a, Campos-Nonato *et al.*, 2018).

En este contexto, la HTA representa uno de los factores de riesgo más importantes para desarrollar enfermedad cerebrovascular y falla renal en todos los grupos de

edad, raza y género, además, es el principal factor de riesgo para desarrollar una ECV. El mayor riesgo asociado con la elevación de la presión arterial puede reducirse considerablemente con el empleo de fármacos antihipertensivos que disminuyan la presión arterial, reduzcan la disfunción endotelial y el riesgo de daño del órgano blanco. En este sentido, es importante mencionar que el aumento persistente de la presión arterial sobre valores normales puede ocasionar lesiones en distintos órganos, principalmente en el cerebro, riñón y corazón (Forouzanfar *et al.*, 2017; Knox, 2019). No obstante, a pesar de ser el principal factor de riesgo, la HTA es modificable, prevenible y su aparición puede ser retardada (Barba, 2018).

La HTA representa un conjunto de anomalías bioquímicas de origen genético, que puede ser modulado por diversos factores ambientales. Estos últimos alteran la gravedad y el momento de inicio. El 90 % de los casos clínicos no tienen etiología definida. Los principales mecanismos fisiopatológicos de la hipertensión incluyen la activación del sistema nervioso simpático y el sistema renina-angiotensina-aldosterona (Maicas, 2003; Oparil *et al.*, 2003).

Las causas de la elevación de la presión arterial pueden deberse a: (1) un aumento de la actividad del sistema nervioso simpático, relacionado con una mayor exposición o respuesta al estrés psicosocial; (2) sobreproducción de hormonas y factores vasoconstrictores que retienen el sodio; (3) ingesta dietética inadecuada de potasio y calcio; (4) ingesta alta de sodio a largo plazo; (5) secreción elevada de renina, asociada con la producción incrementada de angiotensina II y aldosterona; (6) deficiencia de factores vasodilatadores, tales como la prostaciclina, el óxido nítrico (**NO**) y los péptidos natriuréticos; (7) alteraciones en la expresión del sistema caliceína-cinina que afectan el tono vascular y el control de la homeostasis renal de cloruro de sodio; (8) anomalías de los vasos sanguíneos de resistencia; (9) alteraciones en los receptores adrenérgicos que influyen en la frecuencia cardíaca, las propiedades inotrópicas del corazón y del tono vascular; (10) el transporte alterado de iones o (11) anomalías estructurales y funcionales en la vasculatura, incluida la disfunción endotelial, el aumento del estrés oxidativo y la remodelación vascular (Oparil *et al.*, 2003).

La OMS, en apoyo a los esfuerzos de los países, elaboró un plan de acción global para la prevención y control de las enfermedades no transmisibles 2013-2020, para reducir la comorbilidad y mortalidad provocada por este tipo de padecimientos. Este plan de acción se basa en la prevención y manejo de las ECNT, disminuyendo los factores de riesgo conductuales (cambios en el estilo de vida, nutrición, actividad física, tabaquismo, estrés, etc.) y biológicos (predisposición hereditaria y desarrollo de enfermedades conjuntas), además de la terapia farmacológica (OPS, 2019).

Dado que las personas con HTA en etapas tempranas son asintomáticas o presentan síntomas generalizados, la mayoría de los pacientes no son diagnosticados, ni tratados de manera eficiente. El limitado acceso a la salud en algunos países y el alto costo de los medicamentos ha obstaculizado su detección temprana y contribuido al desarrollo de ECV, por lo que la eficacia de los medicamentos se ve comprometida. En este contexto, las causas y las consecuencias de la HTA se ven influenciadas por diversos elementos, tales como la ubicación geográfica, la disponibilidad de servicios de salud, y el estilo de vida. Por este motivo, la búsqueda de terapias de fácil acceso es un factor muy importante a considerar en el proceso de desarrollo de nuevos medicamentos antihipertensivos (OMS, 2013b).

En la actualidad, se cuenta con un total de 69 medicamentos aprobados por la *Food and Drug Administration (FDA)* para el tratamiento de la hipertensión. Sin embargo, a pesar de la cantidad de antihipertensivos actualmente disponibles, la HTA permanece mal controlada en la mayoría de los pacientes, debido a la baja eficacia de los antihipertensivos en monoterapia, el uso ineficiente de terapias combinadas y a la falta de adherencia al tratamiento (Düsing *et al.*, 2017; Sinha y Argarwal, 2019). En México, aproximadamente el 15 % de los pacientes presentan hipertensión resistente (incontrolada), el 50 % se mantiene dentro de los valores normales y el resto de los pacientes (35 %) no tienen adherencia al tratamiento farmacológico o presentan intolerancia al medicamento (Rosas-Peralta, 2016).

2.3. Tratamiento de la hipertensión arterial

El tratamiento de la hipertensión tiene como objetivo primario disminuir la morbimortalidad cardiovascular de la manera menos invasiva posible. De manera inicial, se recomienda el tratamiento no farmacológico que incluye modificaciones en el estilo de vida, restricción de sodio en la dieta (5-6 g por día), control de peso, actividad física, moderación de la ingesta alcohólica e incorporación de una dieta apropiada rica en frutas y vegetales y baja en grasa (OPS, 2019).

Cuando la modificación en la dieta y el incremento de actividad física no son suficientes para controlar los valores de la presión arterial se contempla el abordaje farmacológico. Los principales fármacos empleados para tratar la HTA son los antagonistas β adrenérgicos, los bloqueadores de canales de calcio tipo L, los antagonistas de los receptores AT_1 , los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y los diuréticos (Andrade-Castellanos, 2015; Sinha y Agarwal, 2019).

2.3.1. Antagonistas α_1 adrenérgicos

Los receptores α_1 adrenérgicos son receptores acoplados a proteínas Gq, cuya estimulación induce la activación de la fosfolipasa C (**PLC**) que hidroliza el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (**PIP₂**), dando como resultado inositol-1,4,5-trifosfato (**IP₃**) y diacilglicerol (**DAG**). El **IP₃** moviliza el calcio de almacenes intracelulares a través del receptor sensible a **IP₃** (**RIP₃**) en el retículo sarcoplásmico (**RS**), lo cual provoca un aumento de la concentración de calcio intracelular en el músculo liso que conduce a un aumento de la contractilidad y, por consecuencia, de la presión arterial (Brunton *et al.*, 2017; Lorenzo *et al.*, 2008).

Los antagonistas α_1 adrenérgicos inhiben los efectos de las catecolaminas e inducen un efecto vasodilatador arterial y venoso, provocando la disminución de la resistencia periférica y la disminución de la presión arterial (Lorenzo *et al.*, 2008).

2.3.2. Antagonistas β adrenérgicos

Los receptores β adrenérgicos son receptores acoplados a proteínas Gs, cuya estimulación activa a la adenilato ciclasa (**AC**) que forma adenosín monofosfato cíclico (**AMPc**) a partir del adenosín trifosfato (**ATP**), que funge como un segundo mensajero intracelular. El aumento de AMPc intracelular activa una proteína cinasa dependiente de AMPc (**PKA**). La PKA fosforila proteínas contráctiles (troponina I), al receptor de rianodina (**RyR**), a los canales de calcio y al fosfolamban (**PLB**), lo que origina un aumento de la contractilidad (acción miotropa) y aceleración de la relajación muscular del corazón (acción lusitropa). La fosforilación de los canales de calcio tipo L estimula una mayor entrada de calcio intracelular y la fosforilación del RyR incrementa la disponibilidad de calcio ligado al RS (acción inotrópica). De manera adicional, la fosforilación de la troponina I, acelera la recaptación de calcio por parte del RS y la fosforilación del PLB acelera la disociación del Ca^{2+} en los miofilamentos (efecto lusitropo) (Sanz-Rosa, 2011; Giannopoulos *et al.*, 2016).

El mecanismo de acción de los antagonistas β adrenérgicos o bloqueadores β es antagonizar, de manera competitiva, los efectos de las catecolaminas sobre estos receptores β en el miocardio, ejerciendo un efecto inotrópico negativo. El bloqueo de los receptores β en el corazón conduce a la reducción de la contractilidad miocárdica, la frecuencia cardíaca y la presión arterial. El nombre genérico de la familia de los bloqueadores β tiene terminación “-lol”, por ejemplo, propanolol y atenolol (Brunton *et al.*, 2007; Giannopoulos *et al.*, 2016).

2.3.3. Antagonistas de los receptores AT_1

Los receptores AT_1 son receptores acoplados a proteínas Gq, cuya estimulación produce la activación de la PLC que hidroliza el PIP_2 en IP_3 y DAG. El IP_3 interacciona con su receptor RIP_3 , localizado en el RS, lo cual provoca la salida del calcio y un aumento de su concentración en el citosol. En el músculo cardíaco incrementa la contractilidad y la frecuencia cardíaca, en el músculo liso vascular aumenta el tono arteriovenoso, en la corteza suprarrenal aumenta la síntesis de

aldosterona y en la medula suprarrenal potencia la liberación de catecolaminas (Brunton *et al.*, 2007; Lorenzo *et al.*, 2008).

Los antagonistas de los receptores AT₁ inhiben de forma competitiva la unión de la angiotensina II, ejerciendo vasodilatación, reducción de los niveles de vasopresina, reducción de la producción y secreción de aldosterona, entre otras acciones, en consecuencia, disminuyendo la presión arterial. El nombre genérico de los fármacos que pertenecen a esta familia tiene terminación “-sartán”, por ejemplo, losartán y valsartán (Lorenzo *et al.*, 2008).

2.3.4. Bloqueadores de canales de calcio tipo L

La apertura de los canales de calcio voltaje dependientes, producida por un cambio en el potencial de membrana, permite la entrada de calcio al espacio intracelular. La elevación en los niveles de este catión da como resultado la formación de los complejos calcio-calmodulina en las células vasculares del músculo liso y calcio-troponina en células del corazón. El complejo calcio-calmodulina/troponina activa la proteína cinasa de la cadena ligera de miosina (**MLCK**) que fosforila la cadena ligera de miosina (**MLC**). La MLC fosforilada favorece la interacción de la actina y la miosina, lo que resulta en una contracción del músculo liso (Giannopoulos *et al.*, 2016).

Los bloqueadores de los canales de calcio (**CCBs**) impiden la entrada de calcio al interior de los cardiomiocitos y de las células del músculo liso vascular y, en consecuencia, reducen la contractilidad del corazón y aumentan la vasodilatación. Entre los fármacos bloqueadores de canales de calcio tipo L se encuentran: la nifedipina, el verapamilo y las piperazinas (Lorenzo *et al.*, 2008; Giannopoulos *et al.*, 2016).

2.3.5. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

La enzima convertidora de angiotensina (**ECA**) elimina el motivo histidil-leucina en el carbonilo terminal de la angiotensina I para formar un potente octapéptido vasoconstrictor, la angiotensina II. La angiotensina II estimula la secreción de aldosterona que, a su vez, aumenta la presión arterial al promover la retención de sodio y agua. Además, la ECA degrada la bradiquinina, que estimula la liberación de NO y prostaglandinas que poseen propiedades vasodilatadores y antiproliferativas (Lorenzo *et al.*, 2008; Gutiérrez-Román *et al.*, 2020).

Los inhibidores de la ECA (**IECA**) son inhibidores competitivos de la ECA que reducen los niveles plasmáticos de angiotensina II. Los IECA atenúan la respuesta de la angiotensina II, reduciendo la producción y secreción de la vasopresina y aldosterona y ejerciendo un efecto vasodilatador a través de la bradiquinina. El nombre genérico de los miembros de esta familia tiene la terminación “-pril”, por ejemplo: captopril, enalapril, etc (Bruton *et al.*, 2007).

2.3.6. Diuréticos

Los riñones desempeñan una función directa en el control del volumen sanguíneo mediante la reabsorción de iones en el organismo. La disminución de la concentración de Na^+ corporal conduce a una reducción del volumen sanguíneo y, como consecuencia, a un decremento de la presión arterial y del gasto cardiaco. Los diuréticos incrementan la tasa de excreción de Na^+ y otros iones mediante el bloqueo de co-transportadores. Existen tres tipos de diuréticos: las tiazidas, los diuréticos de asa y los ahorradores de potasio (Brunton *et al.*, 2007; Lorenzo *et al.*, 2008).

Los diuréticos tiazídicos inhiben el cotransportador $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{H}_2\text{O}$ en el túbulo contorneado distal de la nefrona, que es el responsable de la reabsorción de alrededor del 5 % del sodio total. Los diuréticos de asa inhiben el cotransportador de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ en la membrana apical de las células epiteliales tubulares renales, ubicadas en la rama ascendente gruesa del asa de Henle, que es el responsable de

la reabsorción de alrededor del 25 % del sodio y los ahorradores de potasio, inhiben el intercambio de Na^+/K^+ en el túbulo contorneado distal y en el colector (Brunton *et al.*, 2007; Sinha y Agarwal, 2019).

Los diuréticos reducen la presión arterial aguda al causar natriuresis, lo que reduce el volumen extracelular, el retorno venoso y, en última instancia, el gasto cardíaco. El mecanismo que causa la caída de la resistencia periférica total es desconocido, pero puede estar relacionado con una pequeña reducción en el volumen (Sinha y Agarwal, 2019).

2.3.7. Otros vasodilatadores

2.3.7.1. Hidralazina

El RS es el principal almacén de calcio intracelular que participa en la regulación del calcio intracelular. Durante la relajación muscular, el Ca^{2+} es trasladado del citoplasma al RS, principalmente por la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico (**SERCA**), liberando al exterior Na^+/Ca^+ . El PLB en su estado desfosforilado es un inhibidor de la actividad de SERCA. De manera normal, la PKA fosforila al PLB que activa la SERCA y provoca una disminución de la concentración de calcio intracelular y como consecuencia la vasodilatación (Reyes y Zarain, 2006; Lorenzo *et al.*, 2008).

El mecanismo de acción de la hidralazina aún no se encuentra totalmente elucidado, sin embargo, su efecto se asocia a la disminución de las concentraciones intracelulares de calcio, mediante la activación de la PKA y la consecuente fosforilación de SERCA que permite la recaptación de calcio al RS (Dehghan *et al.*, 2019; Sinha y Agarwal, 2019).

2.3.7.2. El minoxidilo

El minoxidilo es un profarmaco (*N*-O-sulfato de minoxilo) que estimula la apertura de los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) en el músculo liso,

permitiendo el flujo de salida de potasio, que conduce a la hiperpolarización del músculo liso y a la relajación del mismo, causando dilatación arteriolar (Sica, 2004).

2.3.8. Desventajas de los antihipertensivos disponibles

El tratamiento farmacológico para la HTA esencial no complicada y sin comorbilidades asociadas debe iniciarse con monoterapia. Sin embargo, los diuréticos tiazídicos, los IECAS y los bloqueadores de canales de calcio pueden prescribirse como antihipertensivos de primera línea en pacientes sin diabetes o insuficiencia renal crónica (Andrade-Castellanos, 2015; Düsing *et al.*, 2017).

La mayoría de los antihipertensivos disponibles presentan diversas desventajas, entre las que destacan: su eficacia limitada, lo cual conlleva a la necesidad de administrar una terapia combinada; la presencia de efectos secundarios; el desarrollo de tolerancia y las limitaciones en su uso cuando se presentan patologías concomitantes (diabetes y falla renal). En este contexto, la búsqueda de fármacos antihipertensivos con mayor eficacia y menos efectos secundarios, más específicos y de mayor accesibilidad para la población sigue siendo una de las mayores necesidades y desafíos médicos (Andrade-Castellanos, 2015; Ren-Ren *et al.*, 2015).

2.4. Medicina tradicional

El empleo de plantas con fines medicinales es una práctica ancestral que se extiende hasta la actualidad. A lo largo del tiempo, el hombre ha recurrido a la naturaleza para satisfacer sus necesidades básicas, empleando a las plantas como base para mantener la salud e incrementar su calidad de vida. El conocimiento en el empleo de las plantas ha sido transmitido y documentado a través de generaciones, lo que originó la conformación de la medicina tradicional (**MT**), la cual es definida por la OMS como la suma de todos los conocimientos, capacidades y prácticas basadas en teorías, creencias y experiencias propias, de diferentes culturas, bien sean explicables o no, utilizadas para mantener la salud, prevenir,

diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales (Prieto-González *et al.*, 2004; OMS, 2013a).

De acuerdo a datos de la OMS, se estima que el 80 % de la población utiliza la MT para complementar sus necesidades básicas de salud, representando la principal fuente de atención primaria y en ocasiones la única, debido a que es accesible y culturalmente aceptable, considerándose el medio más utilizado para el tratamiento de un amplio número de enfermedades, principalmente las ECNT. No obstante, a pesar de la inocuidad y eficacia documentada por generaciones y su extenso uso a través del tiempo, la MT no se encuentra oficialmente reconocida en la mayoría de los países, ya que la calidad de los datos disponibles sobre su inocuidad y eficacia distan mucho de ser suficientes para satisfacer los criterios necesarios para su utilización a escala mundial (Hernández, 2005; OMS, 2013a).

En los sistemas de salud en todo el mundo, los niveles de enfermedades crónicas y los costos de atención primaria son cada vez más elevados; tanto los pacientes como los prestadores de atención de salud exigen la revitalización de los servicios de salud en la aplicación del acceso a productos y prácticas alternativas. La MT es una de las principales prácticas de atención de salud, ya que la disponibilidad de los servicios de salud basados en la medicina alópata convencional suele ser limitada. La utilización generalizada de la MT se puede atribuir al hecho de que es asequible y cuenta con respaldo etnofarmacológico. En numerosos países en desarrollo, la MT cumple una función esencial para satisfacer las necesidades de atención primaria de salud en la población, donde el acceso a la atención médica y los medicamentos se encuentra limitado por factores económicos y culturales (OMS, 2013).

Por el uso creciente de múltiples modalidades médicas en los últimos años, en conjunto con la necesidad de proporcionar atención médica a todas las personas en países desarrollados y en vías de desarrollo, surgió la necesidad de validar la MT con base científica. La OMS considera a la MT en sus programas de salud y sugiere procedimientos básicos para su integración a los servicios de salud, mediante la reglamentación y la investigación de los productos a base de plantas, utilizados con

finés medicinales. Además, se reconoció la obligación de los gobiernos de mantener la salud e impulsar políticas de reglamentación y normas nacionales que garanticen el uso apropiado de las plantas medicinales y los productos elaborados a partir de ellas, mediante la implementación de métodos de control de calidad más estrictos, en los que se incluya su estandarización (Fong, 2002; OMS, 2013a).

En la actualidad, la validación de los productos elaborados a partir de plantas es insuficiente para su integración, sin embargo, la información etnofarmacológica documentada a través de generaciones sobre el modo de empleo, parte utilizada, posología y colectas estacionales son un muy valioso punto de partida lógico para la elección de plantas candidatas para la búsqueda de nuevas entidades químicas (**NEQ**) que puedan servir como base para el desarrollo de extractos estandarizados, fitomedicamentos y nuevos fármacos (Uzuner *et al.*, 2012; De-an *et al.*, 2015; Villarreal-Ibarra *et al.*, 2015).

2.5. Productos naturales como fuente de moléculas bioactivas

Desde la antigüedad, la naturaleza ha contribuido de manera significativa en el mantenimiento de la salud, de manera inicial mediante el empleo de productos crudos, como medicamentos y posteriormente proporcionando estructuras para el desarrollo de nuevos fármacos. La investigación de los productos naturales (**PN**) dio el paso al aislamiento de los primeros compuestos con actividad farmacológica, que posteriormente fueron desarrollados como medicamentos, tales como cocaína, codeína, digitoxina, quinina y morfina, que actualmente permanecen en la terapéutica (Vanegas, 2017).

En la naturaleza, las interacciones entre los organismos y su medio ambiente son extremadamente complejas. Los organismos desarrollaron una formidable y diversa capacidad biosintética, la cual les ha posibilitado adaptarse a sus hábitats y a su medio ambiente en situaciones de estrés (biótico y abiótico). Gracias a esta capacidad, la naturaleza provee moléculas con características estructurales diseñadas para interactuar con estructuras biológicas específicas, como enzimas,

receptores o ácidos nucleicos, etc. que permiten el desarrollo de medicamentos con alta especificidad a los blancos endógenos (Ferro, 2015).

A pesar del éxito en el desarrollo de nuevos fármacos a partir de los PN, con la llegada de la era tecnológica, se han implementado numerosas alternativas en la búsqueda y desarrollo de nuevos medicamentos, tales como la síntesis química, la química combinatoria, la biotecnología, el modelado molecular (técnicas *in silico*) y el cribado de alto rendimiento (**HTS**), lo cual condujo a un decremento en la búsqueda de moléculas bioactivas a partir de PN durante la década de los 90's (Avendaño-López, 2011). Sin embargo, en gran medida debido a que el éxito en el descubrimiento de NEQ no fue como se esperaba, a la fecha la naturaleza y los productos naturales siguen siendo considerados como un recurso muy importante para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (Stratton *et al.*, 2015; Newman y Cragg, 2020).

Hoy en día, los PN son una fuente comprobada para la obtención de NEQ que pueden servir como base para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos de acuerdo a las directrices establecidas por la FDA. Cabe destacar que la FDA reveló que los PN y sus derivados representan más de un tercio (36 %) de todas las NEQ desde 1981 hasta el 2018. Además, éstas representan el 28 % de todas las moléculas pequeñas aprobadas en 2019 hasta la emisión de la revisión, dirigidas principalmente para el tratamiento de enfermedades infecciosas, cáncer, hipertensión, diabetes e inflamación (Newman y Cragg, 2020).

2.6. Biodiversidad en México

México es reconocido a nivel mundial por albergar un capital natural excepcional, que lo ubica como el segundo país con mayor variedad de ecosistemas terrestres y acuáticos dentro de los países mega diversos. Nuestro país es considerado como región de gran interés por la diversidad que presenta en sus recursos naturales, en especial por su extraordinaria riqueza florística, la cual lo posiciona como el cuarto lugar a nivel mundial con 27,322 especies de plantas vasculares distribuidas en su amplio territorio, que incluye áreas subtropicales, zonas templadas, desérticas y

frías, con un alto porcentaje de endemismo. Además de la diversidad de especies, aproximadamente del 50 al 60 % de especies de plantas son endémicas de México (SEMARNAT, 2016; Villaseñor, 2016).

El número estimado de plantas utilizadas en México con fines medicinales es de 4,500 especies que representa el 15 % de la flora total, de las cuales solo el 11 % se ha estudiado químicamente; el 2.6 % ha sido objeto de estudios fitoquímicos bio-dirigidos y solo el 1.9 % cuenta con estudios farmacológicos y toxicológicos. De hecho, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos se ha llevado a cabo en tan solo el 5 % de las especies (Ocegueda *et al.*, 2005).

2.7. Familia Asteraceae

La familia Asteraceae se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial con una alta representación en el territorio mexicano. Esta familia constituye el grupo vegetal más diverso de plantas vasculares sobre el planeta; su distribución es ampliamente cosmopolita y es una de las familias más comunes en la mayor parte de los hábitats, que se caracteriza por sus inflorescencias dispuestas en capítulos. La riqueza de la familia a nivel mundial se estima entre 1,500 y 1,700 géneros y entre 24,000 y 30,000 especies. En México, se estima la existencia de 361 géneros y 3,012 especies (García-Sánchez *et al.*, 2014; Bessada *et al.*, 2015).

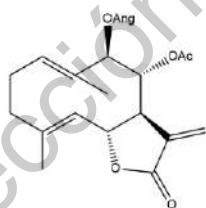
El uso recurrente de esta familia en la MT ha impulsado a la búsqueda de moléculas con propiedades farmacológicas dirigidas principalmente a las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y neoplásicas. Las especies pertenecientes a la familia Asteraceae se caracterizan por la presencia de flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides, diterpenos, cumarinas y lactonas sesquiterpénicas. Cabe destacar que este tipo de compuestos han demostrado propiedades antioxidantes, analgésicas y antiinflamatorias (Bessada *et al.*, 2015; Chagas-Paula *et al.*, 2015).

A pesar del vasto conocimiento sobre la existencia y capacidad de este tipo de moléculas, la identificación y caracterización de los compuestos de origen vegetal,

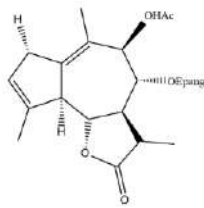
se ha complicado, ya que suelen ser enmascarados por compuestos mayoritarios que pueden o no presentar actividad biológica, lo que dificulta la purificación de las moléculas bioactivas (Bessada *et al.*, 2005). Es por ello, que resulta importante la caracterización fitoquímica completa de las plantas utilizadas en la MT para la búsqueda de compuestos biológicos con actividad farmacológica aún desconocida, mediante estudios biodirigidos.

2.8. Género *Heliopsis*

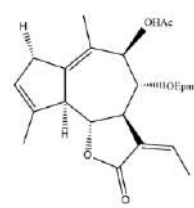
El género *Heliopsis* pertenece a la tribu *Helianthaeae* que comprende cerca de 2,500 especies con cerca de 189 géneros. El género *Heliopsis* es endémico del continente americano, se distribuye desde el centro-este de Estados Unidos hasta el norte de Bolivia, incluye 14 especies, la mayoría de ellas endémicas de México y no totalmente definidas. Dentro de esta familia, existe un especial interés farmacológico en este género, ya que se caracteriza por la presencia de un gran número de alcanidas alifáticas y acetilénicas, así como también de abundantes lactonas sesquiterpénicas. Cabe destacar que las alcanidas se consideran compuestos bioactivos que producen una respuesta farmacológica significativa en cantidades muy pequeñas (García-Chávez *et al.*, 2004). Los compuestos aislados a partir de especies pertenecientes a este género se recopilan en la **Figura 1**.



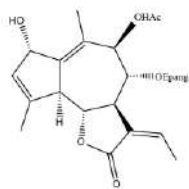
8 α -acetoxi-9 β -angeloiloxi-germacra-1E,4E,11 (13)-trien-12,6 α -oilde (Jakupovic *et al.*, 1987)



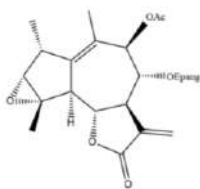
9 β -acetoxi-8-O-[2,3-epoxi-2-metilbutiril]-8-desacetil-11 β ,13-dihidro-zuzubergenina (Jakupovic *et al.*, 1987)



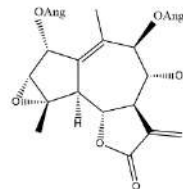
9 β -acetoxi-8-O-[2,3-epoxi-2-metilbutiril]-desacetilzuzubergenina (Jakupovic *et al.*, 1987)



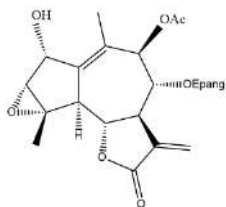
9β-acetoxi-2α-hidroxi-8-O-[2,3-epoxi-2-metilbutiril]-desacetilzuzuvergenin (Jakupovic *et al.*, 1987)



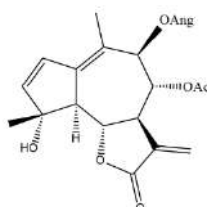
9β-acetoxi-8α-[2,3-epoxi-2-metilbutiriloxi]-ludartina (Jakupovic *et al.*, 1987)



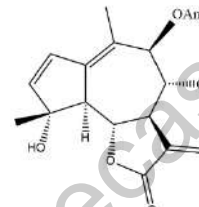
2α,9β-diangeloiloxi-8α-hidroxiludartina (Jakupovic *et al.*, 1987)



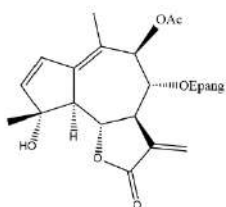
2α-hidroxi-9β-metoxi-8α-[2,3-epoxi-2-metilbutiril oxil]-ludartina (Jakupovic *et al.*, 1987)



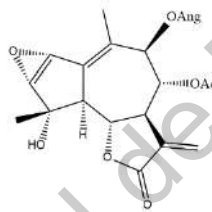
Heliopsolida-8-O-acetato (Jakupovic *et al.*, 1987)



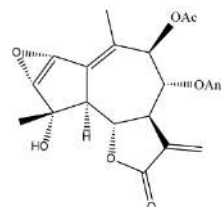
Heliopsólido (Jakupovic *et al.*, 1987)



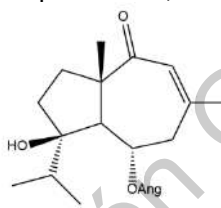
9-O-acetil-8-O-[2,3-epoxi-2-metilbutiril]-desacil-heliopsoide (Jakupovic *et al.*, 1987)



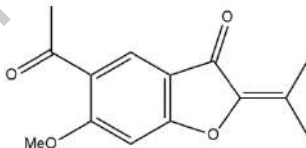
2α,3α-epoxi-8-O-acetato (Jakupovic *et al.*, 1987)



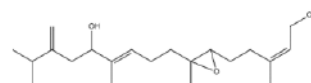
2α,3α-epoxi-9-O-acetil-8-O-angeloil-desacil-heliopsólido (Jakupovic *et al.*, 1987)



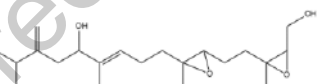
5α-angeloiloxi-7β-hidrohidauca-2-en-1-ona (Jakupovic *et al.*, 1987)



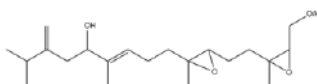
5-acetil-2-isopropilidene-6-metoxi-benzouran-3-ona (Jakupovic *et al.*, 1987)



1-acetoxi-12-hidroxi-6,7-epoximalanta-2Z,10E,14(21)-trieno (Jakupovic *et al.*, 1987)



1,12-dihidroxi-2,3,6,7-bisepoximalanta-10E,14(21)-dieno (Jakupovic *et al.*, 1987)



1-acetoxi-12-hidroxi-2,3,6,7-bisepoxysmalanta-10E,14(21)-dieno (Jakupovic *et al.*, 1987)



Isobutilamida del ácido octadeca-2E,4E,8E,10Z,14Z-pentaneno-12-inoico (Zsanett *et al.*, 2014)

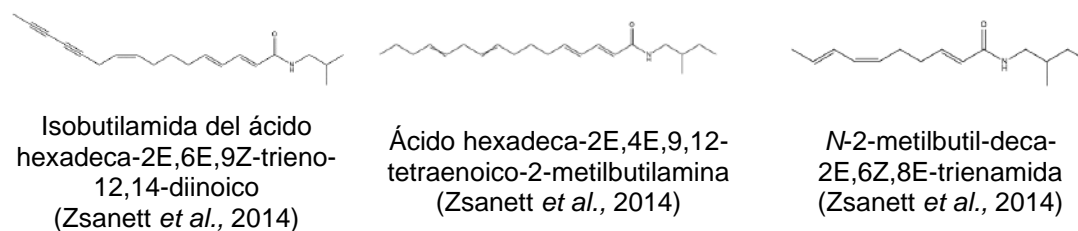


Figura 1. Compuestos aislados a partir de especies del género *Heliopsis*

2.9. *Heliopsis longipes*

Heliopsis longipes (A. Gray) S.F. Blake (Blake, 1979) es una planta perenne localizada en el centro de la república mexicana y endémica de la Sierra de Álvarez y la Sierra Gorda entre los estados de San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro, comúnmente conocida como chilcuague, chilguahue, pelitre, raíz de oro, chilmécal (Nahuatl), entre otros (Cilia-López *et al.*, 2013).

Es una planta herbácea que mide entre 0.5 y 0.7 m de altura; con raíces fibrosas, tallos herbáceos, decumbente y subdecumbente de color rojizo-purpura, leñosa en la base, hojas opuestas, pecíolo ovado a oblongo con margen serrado a ligeramente dentado cerca del ápice, de 5-11 flores de color amarillo, hermafroditas con hojas lineares a oblongo-elípticas y ápice tridentado (**Figura 2**) (Cilia-López *et al.*, 2013).

Dentro de su género, *H. longipes* es la especie con mayor importancia económica por sus usos culinarios, insecticidas y medicinales. En la medicina tradicional, la raíz de esta especie vegetal es utilizada para el tratamiento de algunas enfermedades, incluyendo el dolor de muelas, gingivitis y dolor muscular (Cilia-López *et al.*, 2013; Castro-Ruiz *et al.*, 2017).



Figura 2. Características morfológicas de *Heliopsis longipes*. a) ejemplar completo, b) inflorescencia, c) raíces y d) tallos y hojas de la especie vegetal.

2.9.1. Estudios fitoquímicos realizados sobre *H. longipes*

Las moléculas bioactivas predominantes encontradas en la raíz de *H. longipes* son las *N*-alquilamidas o alcanidas, principalmente la *N*-isobutil-2E, 6Z, 8E-decatrienamida conocida como afinina o espilantol (Acree *et al.*, 1945). La afinina es la alcanida mayoritaria y el principal compuesto responsable de los efectos biológicos demostrados a la raíz. Estudios *in vitro* e *in vivo* de la afinina evidenciaron su excelente capacidad lipofílica por difusión pasiva; es capaz de penetrar la piel y la mucosa oral y, posteriormente, alcanzar la circulación sanguínea y atravesar la barrera hematoencefálica en grandes cantidades (~98 %), lo que le confiere gran capacidad para ejercer múltiples efectos farmacológicos (García-Chávez *et al.*, 2004; Castro-Ruiz *et al.*, 2017).

Además de la afinina, se han aislado tres dihidroxialcanidas lineales: longipinamida A (*N*-isobutil-8,10-diinoico-3Z-undecenamida), longipenamida A (*N*-isobutil-sin-8,9-dihidroxi-2E, 6Z-decadienamida) y longipenamida B (*N*-isobutil-sin-6,9-dihidroxi-2E,

7E-decadienamida) que se encuentran en menor proporción en la raíz y que hasta la fecha no cuentan con actividad vasodilatadora reportada (López-Martínez *et al.*, 2011).

Estudios fitoquímicos previamente realizados han permitido el aislamiento de otro tipo de compuestos como el éster de borilo de deca-2E, 6Z, ácido 8E-trienoico (Molina-Torres *et al.*, 1995), *N*-2-metilbutil-deca-2E, 6Z, 8E-trienamida (Molina-Torres *et al.*, 1996) y undeca-2E-en-8,10-diinoico ácido isobutilamida (López-Martínez *et al.*, 2011). Los compuestos aislados se presentan en la **Figura 3**.

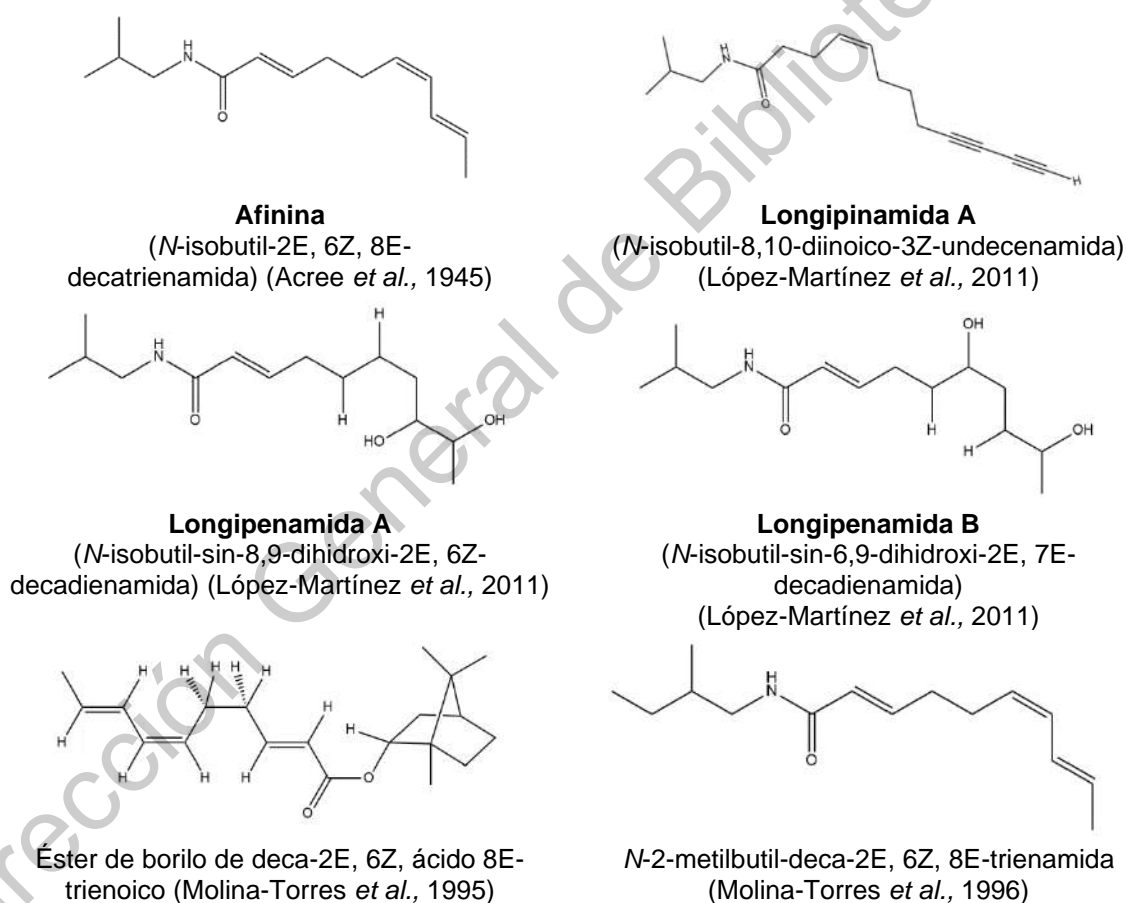


Figura 3. Compuestos aislados de *Heliopsis longipes*.

2.9.2. Estudios farmacológicos realizados sobre *H. longipes*

Dado su empleo en la medicina tradicional y la naturaleza de sus compuestos, se ha evaluado la actividad de *H. longipes* y su componente mayoritario en diversos modelos farmacológicos dirigidos principalmente a comprobar su capacidad analgésica y antimicrobiana; diversos estudios sobre esta especie han demostrado su actividad bactericida (Gutiérrez-Lugo *et al.*, 1996; Molina-Torres *et al.*, 1999), antifúngica (Ramírez-Chávez *et al.*, 2000), analgésica (Cariño-Cortés *et al.*, 2010; Cilia-López *et al.*, 2010), estimulante sobre el sistema nervioso (Cilia-López *et al.*, 2010), nociceptiva (Déciga-Campos *et al.*, 2012) y antiinflamatoria (Hernández *et al.*, 2009).

Estudios recientes demostraron la capacidad vasodilatadora de los extractos de etanol y diclorometano de la raíz de *H. longipes* y de la afinina de manera significativa en el modelo de aorta aislada de rata (Castro-Ruiz *et al.*, 2017). Por este motivo, la raíz de esta especie se considera como un candidato idóneo para la realización de un estudio fitoquímico biodirigido que tenga como objetivo la purificación de todos los compuestos que contribuyen con el efecto vasodilatador presentado por los extractos etanólico y de diclorometano preparados a partir de la raíz del chilcuague.

Además de los estudios farmacológicos, se evaluó la seguridad del extracto de la raíz de *H. longipes*, mediante el método de la clase de toxicidad oral aguda que permitió el cálculo de la dosis letal 50 (**DL₅₀**). El extracto de la raíz de *H. longipes* fue clasificado como moderadamente tóxico con una $DL_{50} = 62.14$ mg/kpc y a la afinina como ligeramente tóxica $DL_{50} = 113.13$ mg/kpc (Déciga-Campos *et al.*, 2012). Considerando los datos obtenidos en el ensayo de toxicidad del extracto y de su compuesto mayoritario, no es posible descartar que el compuesto mayoritario sea el principal responsable de la toxicidad del extracto.

A pesar de que se ha demostrado que la afinina, el componente mayoritario presente en la raíz de *H. longipes*, presenta un potente efecto vasodilatador, a la fecha no es posible descartar la existencia de otros compuestos con propiedades vasodilatadoras similares que contribuyan con el efecto vasorrelajante de los

extractos orgánicos totales. De tal forma que es importante la realización de un estudio fitoquímico biodirigido del extracto de diclorometano de la raíz de *H. longipes*, que permita la purificación y caracterización estructural de otros compuestos, que además de la afinina, también poseen un efecto vasodilatador, los cuales podrían presentar menor toxicidad que la afinina y representar modelos estructurales para el diseño de nuevos fármacos antihipertensivos. Es por ello, que el objetivo del presente estudio fue realizar un estudio fitoquímico de la raíz de *H. longipes* con la finalidad de identificar y caracterizar el mayor número posible de compuestos con efecto vasodilatador.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles, por ser un grupo de padecimientos multifactoriales y de larga duración, representan una de las principales causas de muerte y un gran reto para los sistemas de salud, debido a su alta prevalencia y su incidencia en edades tempranas. Dentro de las ECNT, las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de muerte en el mundo, a su vez, la hipertensión arterial es el principal factor de riesgo para el desarrollo de las ECV en todos los grupos de la población. A pesar de los intentos por prevenir y controlar este tipo de enfermedades, mediante la combinación de estrategias que involucran la disminución de los factores de riesgo conductuales y el tratamiento farmacológico adecuado, el diagnóstico y tratamiento de la mayoría de los pacientes resulta ser ineficiente por el restringido acceso a los sistemas de salud en algunos países, al alto costo de los medicamentos, la eficacia limitada y la presencia de efectos secundarios, lo que provoca que no se tenga una adherencia al tratamiento farmacológico. La búsqueda de fármacos antihipertensivos más eficaces y con menos efectos secundarios, además de ser de acceso libre para la población resulta ser una excelente estrategia para resolver este problema. En este contexto, las plantas utilizadas con fines medicinales representan una alternativa muy valiosa para la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas, las cuales podrían representar novedosos prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos fármacos.

Heliopsis longipes es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana que se caracteriza por exhibir múltiples actividades farmacológicas, entre las que destaca la capacidad analgésica y antiinflamatoria y por la presencia de alcaloides, moléculas con propiedades fisicoquímicas interesantes. De manera adicional, estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, demostraron que el extracto de diclorometano de la raíz de *H. longipes* produce una significativa vasodilatación en el modelo de aorta aislada de rata. Así mismo, se demostró que uno de los principales compuestos responsables del efecto vasodilatador era la afinina, sin embargo, hasta la fecha se desconoce la identidad de otros metabolitos que pudieran contribuir a los efectos reportados.

En este contexto, la caracterización química y farmacológica de la raíz de *H. longipes* posibilita el conocimiento de otros posibles compuestos bioactivos que, además de las alcanidas, contribuyan al efecto vasodilatador que se ha reportado para esta especie, los cuales podrían representar novedosos prototipos estructurales para el desarrollo de fármacos antihipertensivos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La raíz de *Heliopsis longipes* contiene compuestos de naturaleza no polar, diferentes a la afinina, que inducen un efecto vasodilatador en aorta aislada de rata?

5. HIPÓTESIS

La raíz de *Heliopsis longipes* contiene, además de la afinina, terpenos y otras alcaloides que contribuyen al efecto vasodilatador del extracto orgánico crudo.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Purificar y caracterizar la estructura química de los compuestos vasodilatadores presentes en el extracto de diclorometano de la raíz de *Heliopsis longipes*.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar y caracterizar la estructura química de los compuestos presentes en una de las fracciones cromatográficas previamente obtenidas a partir del extracto de diclorometano de la raíz de *H. longipes*.
- Analizar el extracto de diclorometano de la raíz de *H. longipes*, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS), con el objeto de caracterizar el mayor número posible de compuestos no polares de bajo peso molecular.
- Evaluar el efecto vasodilatador de los compuestos puros obtenidos a partir del extracto de diclorometano de la raíz de *H. longipes* y de aquellos identificados mediante el análisis de CG-MS, cuyo efecto vasodilatador no haya sido reportado.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

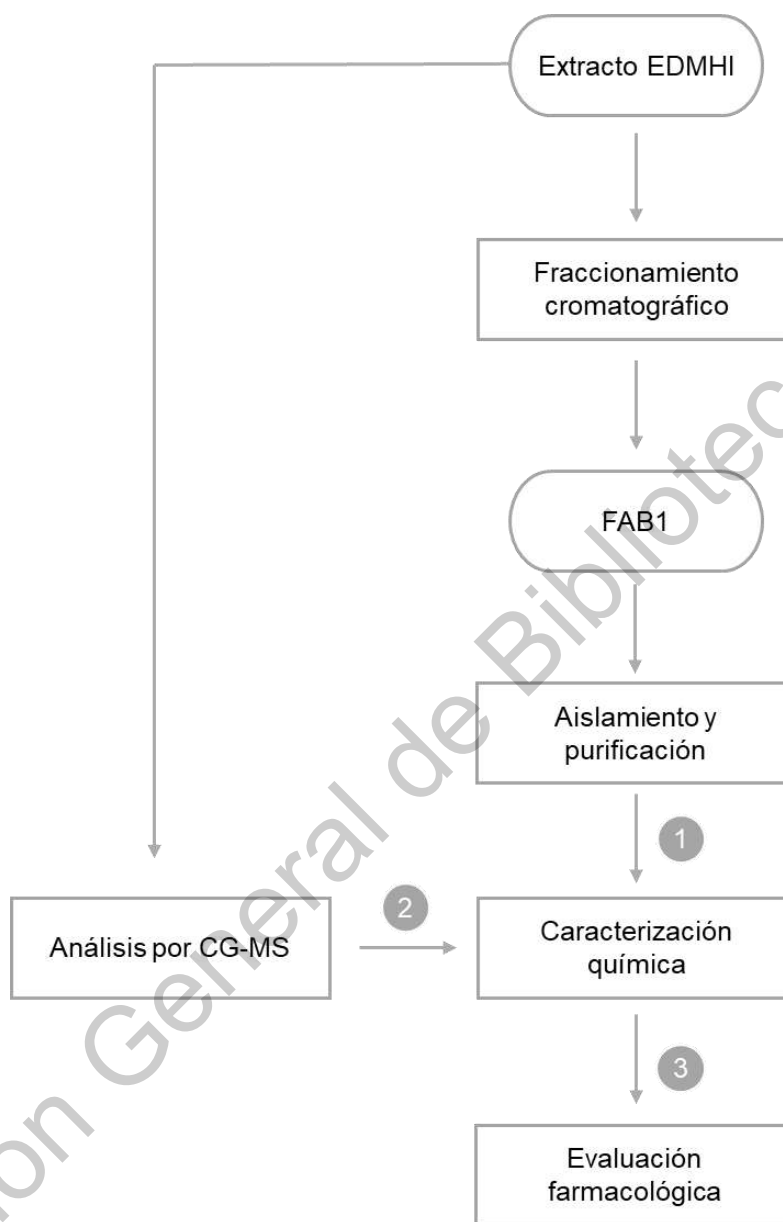


Figura 4. Diseño experimental del estudio químico y farmacológico de la raíz de *Heliopsis longipes*. 1. Aislamiento y purificación de compuestos presentes en la fracción FAB1 previamente obtenida a partir del extracto de diclorometano de la raíz de *H. longipes*. 2. Analizar el extracto de diclorometano, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS). 3. Evaluar el efecto vasodilatador de los compuestos puros y de aquellos identificados mediante el análisis de CG-MS, cuyo efecto vasodilatador no haya sido reportado.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Obtención del extracto total de la raíz de *Heliopsis longipes*

Las raíces de *Heliopsis longipes* se colectaron en el municipio de Peñamiller, Querétaro, México. Los especímenes fueron autenticados y depositados en el Herbario Jerzy Rzedowski (QMEX) en la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro con número de voucher *H. longipes* J.E. Castro R.1 y R.2. Las raíces secas se trituraron y se sometieron a un proceso de maceración sólido-líquido con diclorometano en una proporción 1:10 p/v. La eliminación del solvente se realizó por destilación rotatoria a presión reducida hasta la obtención del extracto seco (Castro-Ruiz *et al.*, 2017).

La colecta, la autenticidad del material vegetal, la preparación del extracto y el fraccionamiento preliminar del extracto completo de diclorometano de *Heliopsis longipes* (EDMHI) fue realizada con anterioridad por miembros de nuestro grupo de trabajo en el Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas en la Universidad Autónoma de Querétaro.

8.2. Análisis del extracto de diclorometano mediante CG-MS

Con el objeto de identificar el mayor número de compuestos volátiles de bajo peso molecular presentes en el extracto de diclorometano, se realizó un análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Este análisis se realizó en colaboración con el Dr. Pedro Vázquez Landaverde en el Centro de Investigación en Ciencias Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional (CICATA) y bajo la asesoría de la Dra. Leticia García Aguilar.

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent 7890^a con detector de ionización a la flama (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EUA) en una columna capilar HP-5MS de 60 m x 0.25 mm de i.d. (Agilent Technologies, Inc.). La ionización del extracto se realizó a una temperatura de 250 °C en modalidad dividida (5:1), consecutivamente, la inyección se inició a 40 °C por 5 min y se incrementó a una velocidad de 5 °C/min hasta alcanzar 230 °C, posteriormente, esta temperatura

se mantuvo por 15 min, utilizando helio como gas acarreador (1 mL/min) (Delgado-Altamirano *et al.*, 2019).

El análisis de espectrometría de masas se realizó en un espectrómetro Agilent 5975C de impacto electrónico con analizador de cuadrupolo. La temperatura de la fuente de iones y del cuadrupolo fueron de 230 °C y 250 °C, respectivamente. La línea de transferencia se colocó a 280 °C y se realizó un escaneo completo en un rango de 33-300 uma a una velocidad de escaneo de 5.3/s con un voltaje de ionización de 70 eV (García-Aguilar *et al.*, 2015; Delgado-Altamirano *et al.*, 2019).

El análisis de los datos se realizó mediante el software MSD ChemStation E.01.00.237 (Agilent Technologies, Inc.) y la identificación de los compuestos se llevó a cabo por medio de su espectro de masas mediante la exploración en la biblioteca digital del programa. Adicionalmente, la identificación de los constituyentes del extracto también se determinó por el método de Kovats utilizando una serie de *n*-alcanos como estándar y la identidad fue confirmada comparando con los índices descritos en NIST-MS y en la literatura (García-Aguilar *et al.*, 2015; Delgado-Altamirano *et al.*, 2019). La abundancia relativa de cada compuesto se determinó a partir de su área bajo la curva.

8.3. Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios mediante CCA

Con la finalidad de purificar la afinina y algunos de los metabolitos secundarios presentes en *H. longipes*, se decidió utilizar la fracción FAB1 obtenida de un fraccionamiento cromatográfico previo del extracto completo de diclorometano (Castro-Ruiz *et al.*, 2017).

El aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la fracción FAB1, se realizó mediante cromatografía en columna abierta (**CCA**). La fase estacionaria utilizada fue de gel de sílice 60 (70:230 mesh ASTM) con tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm y la fase móvil fue un gradiente de polaridad ascendente con *n*-hexano y acetato de etilo en diferentes proporciones. Todo el

proceso fue monitorizado por cromatografía en capa fina (**CCF**), los compuestos presentes en las placas cromatográficas se visualizaron bajo luz ultravioleta (λ 354 nm y λ 365 nm) y fueron revelados con *p*-anisaldehído con ácido sulfúrico (0.5 mL de *p*-anisaldehído en 50 mL de ácido acético glacial y 1 mL de ácido sulfúrico concentrado) a 100 °C (Castro-Ruiz *et al.*, 2017).

La fracción FAB1 (250 mg) fue adsorbida en gel de sílice en una proporción 1:1, una vez homogénea, se colocó en una bureta de vidrio (Kimax, EUA) de 25 mL previamente llenada con 5 g de gel de sílice suspendida en *n*-hexano.

8.4. Evaluación farmacológica

La evaluación farmacológica de los compuestos identificados mediante espectrometría de masas, se realizó mediante el ensayo de aorta aislada de rata, en un sistema de registro isométrico vertical para tejido aislado.

8.4.1 Modelo experimental

La evaluación farmacológica se realizó en ratas macho cepa Wistar con un peso aproximado de 200-250 g. Los animales se obtuvieron del bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla, Querétaro, Qro., México. Durante su estadía, los animales se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h con libre acceso a agua purificada y alimento (Rodent LabDiet 5001, PMI). El manejo de los animales de experimentación se realizó de acuerdo con las especificaciones establecidas por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (SINASICA, 2001).

8.4.2. Ensayo *ex vivo* de aorta aislada de rata

Los animales fueron sacrificados por decapitación con previa anestesia por inhalación de isoflurano (SINASICA, 2001). La aorta torácica se extrajo

quirúrgicamente, se limpió de tejido circulante y se cortó en segmentos de 4 a 5 mm. Posteriormente, los anillos aórticos se colocaron en cámaras de incubación para tejido aislado en condiciones fisiológicas, con oxigenación constante (pH 7.4, O₂/CO₂ 95/5 % y temperatura 37 °C). La actividad vasodilatadora de los compuestos mayoritarios detectados mediante el análisis de CG-MS y de los compuestos puros se evaluó en anillos pre-contraídos con L-fenilefrina (1 µM).

Los cambios en la tensión del tejido fueron registrados mediante un transductor de fuerza Grass FT03 acoplado a un polígrafo Grass 7D y se expresaron como porcentaje de la relajación, basados en la contracción generada por la L-fenilefrina (Ibarra-Alvarado *et al.*, 2010).

La determinación de la concentración efectiva 50 (**EC₅₀**) y del efecto máximo (**E_{max}**) de los compuestos identificados, se realizó mediante una curva concentración-respuesta con 7 concentraciones distintas (1, 3.16, 10, 31.6, 100, 316, 1,000 µL/mL). (Ibarra-Alvarado *et al.*, 2010; Castro-Ruiz *et al.*, 2017).

8.5. Análisis estadístico

Los resultados derivados de los análisis farmacológicos se expresaron como la media ± el error estándar (**SEM**) de los ensayos independientes de al menos cuatro ratas diferentes (*n*= 4).

Los datos resultantes de cada evaluación se ajustaron a una ecuación sigmoidea y se graficaron para calcular la CE₅₀, mediante el software GraphPad Prism® versión 8.01.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Identificación de compuestos volátiles mediante CG-MS

El análisis del EDMHI mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas permitió identificar 42 compuestos, los cuales fueron clasificados de acuerdo a su estructura química como ácidos carboxílicos, aldehídos, alcanidas, ésteres, éteres y terpenos como se muestra en el **Cuadro 1**. Dicho extracto, se caracteriza principalmente por la presencia de compuestos apolares y por la presencia de compuestos volátiles de bajo peso molecular de naturaleza terpenoide.

Cuadro 1. Compuestos identificados en el extracto de diclorometano de la raíz de *H. longipes* mediante CG-MS.

Compuesto	Área (%)	TR ¹	IK exp ²	IK lit ³	Clasificación	MI ⁴
Ácido acético	0.07	6.138	613,42	610	Ácido carboxílico	a,b
Ácido 2-metilpropanoico	0.01	13.54	781,17	785	Ácido carboxílico	a,b
Ácido 3-metilbutanoico	0.01	19.622	871,24	875	Ácido carboxílico	a,b
2-butenal	0.04	7.084	646,30	648	Aldehído	a,b
Hexanal	0.001	14.847	802,42	800	Aldehído	a,b
2,4-decadienal	0.001	44.867	1313,61	1309	Aldehído	a,b
Afinina	46.1	89.254	1991,97	-	Alcanida	a,c
<i>N</i> -2-metilbutil-2E,6Z,8E-decatrienamida	7.75	92.344	2092,64	-	Alcanida	a,c
Salicilato de metilo	0.02	39.055	1201,87	-	Éster	a,c
2-metoxi-4-vinilfenol	0.001	45.028	1316,71	1315	Éster	a,b
9-cis, 11-trans-octadecadienoato de etilo	0.27	96.405	2229,21	-	Éster	a,c
Ácido adípico	0.47	101.606	2427,98	2399	Éster	a,b
Metiltimol	0.05	40.619	1231,94	1235	Éter	a,b
Éter metílico de isotimol	0.001	41.327	1245,55	-	Éter	a
Terbutilhidroquinona	0.01	48.697	1387,25	-	Éter	a
3-aililciclohexeno	0.001	24.534	945,53	-	Terpeno	a
Canfeno	0.01	24.830	950,16	950	Terpeno	a,b
β-pineno	0.002	26.632	978,29	980	Terpeno	a,b
α-felandreno	0.02	28.389	1006,41	1010	Terpeno	a,b
O-cimeno	0.01	29,619	1027,91	1026	Terpeno	a,b
Limoneno	0.02	29.825	1031,51	1032	Terpeno	a,b

Alcanfor	0.001	36.429	1151,50	1156	Terpeno	a,b
Borneol	0.02	37.845	1178,65	1177	Terpeno	a,b
P-cimenol	0.001	38.726	1195,55	1200	Terpeno	a,b
1,1-dimetiletil-4-benzenometanol	0.001	41.327	1245,55	1185	Terpeno	a,c
Timol	0.02	44.648	1309,40	1306	Terpeno	a,b
Varamol	0.001	45.028	1316,71	1315	Terpeno	a,b
Dehidroaromadendreno	0.01	46.644	1347,78	1463	Terpeno	a,c
Epizonareno	0.07	47.873	1371,41	1545	Terpeno	a,c
α -cubebeno	0.04	48.388	1381,31	1381,2	Terpeno	a,b
Cipereno	0.044	50.151	1408,31	1410	Terpeno	a,b
α -gurgujeno	0.01	50.647	1413,51	1409	Terpeno	a,b
Isoledeno	0.01	50.879	1415,95	1377	Terpeno	a,c
β -cariofileno	0.01	51.439	1421,83	1420	Terpeno	a,b
β -malieno	0.01	54.438	1453,32	1413	Terpeno	a,c
α -selineno	0.06	55.867	1468,33	1491	Terpeno	a,c
Valenciano	0.02	57.071	1480,97	1480	Terpeno	a,b
β -pachulén	0.02	60.405	1515,98	1380	Terpeno	a,c
Escualeno	0.46	100.602	2370,34	2817	Terpeno	a,c
1-propanamine, N-(2-furanylmethylene)-2-methyl-	0.001	35.025	1124,57	-	Otro	a,d
Tricyclo[4.1.0.0(2,4)]heptane, 3,3,7,7-tetramethyl-5-(2-methyl-1-pro penyl)-	0.001	49.379	1400,20	-	Otro	a,d
Heneicosane, 3-methyl-2-(5-Adamantan-1-yl-[1,2,4]oxadiazol-3-yl)-pyridine	0.06	104.856	918,16	-	Otro	a,d

¹ Tiempo de retención, ² índice de retención experimental, ³ índice de retención descrito en la literatura, ⁴ método de identificación y confirmación, ^a identificación tentativa mediante la búsqueda en la biblioteca de espectros de masas del software MSD ChemStation E.01.00.237, ^b índice de retención corroborado por NIST, ^c índice de retención corroborado por otra fuente de literatura e ^d índice de retención no confirmado.

De acuerdo a la abundancia relativa de los compuestos identificados, el EDMHI se compone principalmente de alcanidas (53.9 %) y de abundantes terpenos (0.83 %). Las principales alcanidas identificadas en el extracto de diclorometano fueron la afinina (46.1 % de área), y la *N*-2-metilbutil-2E,6Z,8E-decatrienamida (7.75 % de área). Consecutivamente, el ácido adípico (0.47 % de área), el 9-cis, 11-trans-octadecadienoato de etilo (0.27 % de área) y el escualeno (0.46 % de área). Este último, representa el terpeno más abundante, superior a los 12 monoterpenos y 11 sesquiterpenos identificados.

Los resultados del presente estudio concuerdan con los obtenidos en estudios anteriores realizados en la raíz de *H. longipes*, en los que se demuestra que la

afinina es el componente mayoritario presente en esta raíz. López-Martínez *et al.*, (2011) reportó un 45.23 % en el rendimiento de afinina presente en el extracto seco de acetona de la raíz de *H. longipes*. Adicionalmente, en un estudio realizado en la raíz seca de *H. longipes* mediante CG-MS, se identificaron 28 compuestos volátiles, de los cuales, el 85.1 % pertenecen al grupo de los terpenos (53 % de monoterpenos, 25 % de sesquiterpenos y 7.1 % de diterpenos), consecutivamente, el 7.1 % de hidrocarburos oxigenados y el 7.1 % de ésteres, sin detectar la presencia de alcanidas (Aguilar *et al.*, 2016).

Cabe destacar que, a diferencia del estudio realizado por Aguilar *et al.*, (2016), la extracción de metabolitos secundarios en este estudio se realizó mediante una extracción sólido/líquido por maceración con diclorometano, mientras que en el estudio realizado por Aguilar *et al.*, (2016) se realizó mediante microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPM), en donde se colocaron 500 mg de material vegetal seco, cloruro de sodio (75 mg) y agua destilada (10 mL), posteriormente, se acondicionó durante 40 min a 300 °C en fase de vapor para realizar la inyección.

Así mismo, de los 42 compuestos identificados por CG-MS en este estudio, únicamente la afinina (Acree *et al.*, 1945), la *N*-2-metilbutil-2E,6Z,8E-decatrienamida (Molina-Torres *et al.* 1996), el escualeno (López-Martínez *et al.*, 2011), el beta-pineno y el orto-metiltimol (Aguilar *et al.*, 2016) ya habían sido reportados en esta especie vegetal.

Los cambios detectados en el contenido metabólico de la raíz pueden atribuirse principalmente a la época de cosecha y a la presencia de elicitores tanto bióticos y abióticos en el ambiente en donde se desarrolló la planta. Estudios recientes demostraron que las concentraciones de la afinina varían según la época del año en la que se colecta y la presencia de elicitores, esto se correlacionó al aumento o disminución de la actividad de la valina descarboxilasa, enzima relacionada con la biosíntesis de alcanidas alifáticas como la afinina (Parola-Contreras *et al.*, 2020).

9.2. Caracterización química preliminar de los compuestos purificados de la fracción FAB1

La fracción rica en afinina, FAB1, se fraccionó por CCA y se obtuvieron 500 fracciones, las cuales fueron agrupadas por similitud cromatográfica en 26 grupos. Las condiciones de elución y los rendimientos obtenidos se describen en la **Cuadro 2**.

Cuadro 2. Fracciones y grupos obtenidos del fraccionamiento cromatográfico de la fracción FAB1 mediante CCA.

Grupos	Fracciones	Fase móvil	Rendimiento
1	1	hexano/acetato de etilo (98:02)	1.04 %
2	2-3	hexano/acetato de etilo (98:02)	9.60 %
3	4-8	hexano/acetato de etilo (98:02)	3.60 %
4	9-25	hexano/acetato de etilo (98:02)	2.68 %
5	26-40	hexano/acetato de etilo (98:02)	0.88 %
6	41-55	hexano/acetato de etilo (97.5:2.5)	1.60 %
7	56-71	hexano/acetato de etilo (97.5:2.5)	1.80 %
8	73-89	hexano/acetato de etilo (97.5:2.5)	1.08 %
9	90-95	hexano/acetato de etilo (97.5:2.5)	1.40 %
10	95-119	hexano/acetato de etilo (97.5:2.5)	6.48 %
11	120-152	hexano/acetato de etilo (97.5:2.5)	0.12 %
12	153-166	hexano/acetato de etilo (97:03)	0.80 %
13	167-168	hexano/acetato de etilo (97:03)	0.40 %
14	169-178	hexano/acetato de etilo (97:03)	1.20 %
15	179-198	hexano/acetato de etilo (97:03)	0.64 %
16	199	hexano/acetato de etilo (97:03)	0.08 %
17	200-207	hexano/acetato de etilo (96.5:3.5)	0.52 %
18	208-231	hexano/acetato de etilo (97:03)	1.20 %
19	232	hexano/acetato de etilo (97:03)	0.40 %
20	233	hexano/acetato de etilo (97:03)	0.30 %
21	234	hexano/acetato de etilo (97:03)	1.00 %
22	235-258	hexano/acetato de etilo (97.5:2.5)	2.12 %
23	259-350	hexano/acetato de etilo (96:04)	6.00 %
24	351-359	hexano/acetato de etilo (95:05)	2.24 %
25	360-422	hexano/acetato de etilo (94:06)	13.44 %
26	423-500	hexano/acetato de etilo (50:50)	26.00 %

Durante el monitoreo cromatográfico por CCF, en la fracción F72 se observó un residuo aceitoso que mostraba una mancha y una pequeña impureza con coloración rosada al revelar con *p*-anisaldehído que no era observable bajo luz UV, lo cual es característico de triterpenos (Domínguez, 1975), ver en **Figura 5**.

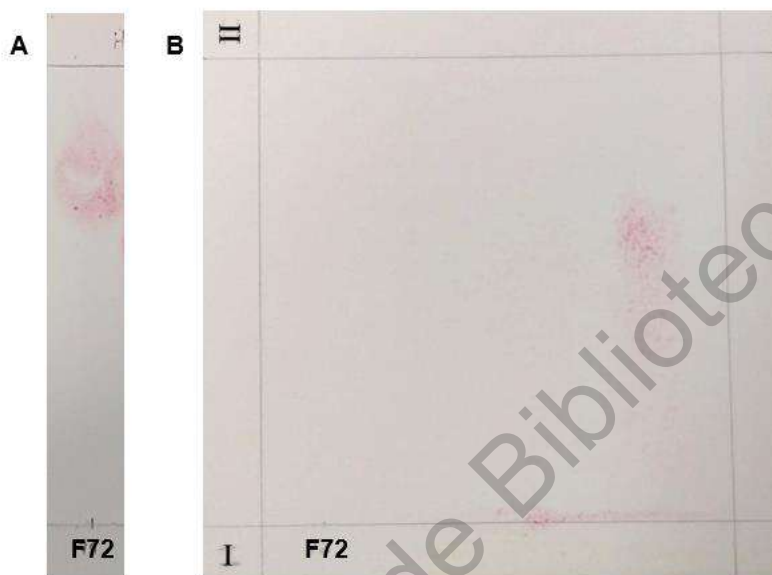


Figura 5. Análisis cromatográfico de la fracción F72 en cromatografía en capa fina **A)** unidimensional y **B)** bidimensional en un sistema de elución de hexano/acetato de etilo (80:20) y (I) hexano (100) y (II) hexano/acetato de etilo (80:20), respectivamente.

Considerando lo anterior, se decidió realizar una placa comparativa con estándares de naturaleza terpenoide, se incluyó el ácido ursólico, el ácido oleanólico, el uvaol, el lupeol, el ácido corosólico, el ácido betulínico y el escualeno, como se muestra en la **Figura 6**. Dado que no se encontró coincidencia entre el factor de retención y en la coloración del revelado de la F72 y los estándares, se descartó la presencia de estos terpenos en la raíz.

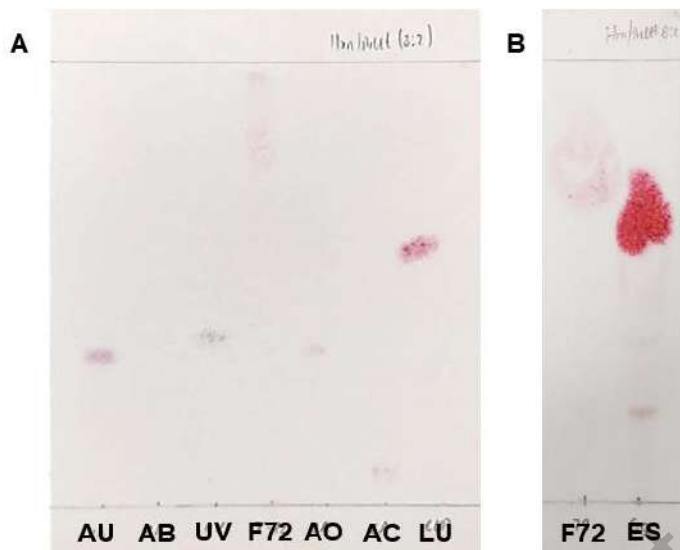


Figura 6. Análisis cromatográfico comparativo de la fracción F72 y los estándares de naturaleza terpenoide. **A)** Ácido ursólico (AU), ácido betulínico (AB), uvaol (UV), ácido oleanólico (AO), ácido corosólico (AC), lupeol (LU) y **B)** el escualeno (ES) en un sistema de elución hexano/acetato de etilo (3:2) y (8:2), respectivamente. Ambas cromatoplasmas fueron reveladas con anisaldehído.

Cabe destacar que el compuesto contenido en F72 muestra menor polaridad con respecto a los estándares utilizados. Considerando lo anterior y el rendimiento obtenido, se decidió realizar un análisis mediante cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (UPLC-MS/QTOF) con la finalidad de lograr identificar el compuesto.

Por otra parte, en las fracciones F13 y F136 se observaron cristales transparentes de consistencia cerosa, los cuales fueron separados y pesados. Adicionalmente, se determinó el punto de fusión mediante el método de Fisher, los cuales presentaron valores de 78-80 °C y 74-76 °C, respectivamente.

9.3. Caracterización química de los compuestos purificados

Considerando el rendimiento obtenido de los compuestos purificados y las restricciones emitidas durante la emergencia sanitaria provocada por el virus SARS-COV2, la identificación de los compuestos purificados por CCA de la muestra FAB1

se realiza actualmente mediante UPLC-MS/QTOF en el Laboratorio Especializado en Análisis de Alimentos de la Facultad de Química de la UAQ. Los compuestos purificados, el rendimiento y su punto de fusión de la muestra FAB1 se muestran en la **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Compuestos purificados mediante CCA de FAB1 obtenida a partir del fraccionamiento cromatográfico del extracto de diclorometano de la raíz de *H. longipes*.

Clave	Descripción	Rendimiento	Punto de fusión
F13	Cristales incoloros de consistencia aceitosa	3.4 mg	78-80°C
F72	Residuo aceitoso	5.9 mg	no aplica
F136	Cristales incoloros de consistencia cerosa.	1.8 mg	74-76°C
F247	Cristales incoloros de consistencia cerosa	1.2 mg	ND

ND= no determinado

9.4. Evaluación del efecto vasodilatador de los compuestos mayoritarios identificados del extracto de diclorometano de la raíz de *H. longipes*.

Con la finalidad de determinar la contribución de los compuestos mayoritarios detectados mediante el análisis de CG-MS, en el efecto vasodilatador del EDMHI, se evaluó la actividad vasodilatadora de los compuestos volátiles con mayor abundancia relativa en el extracto. Una vez identificados, se seleccionaron únicamente aquellos compuestos, cuyo efecto vasodilatador no había sido previamente reportado y que se encontraban disponibles de manera comercial, tales como el ácido adípico y del escualeno.

Los resultados obtenidos de la evaluación farmacológica mostraron que el escualeno indujo una vasodilatación dependiente de la concentración en anillos aórticos con endotelio funcional con valores de $E_{max} = 61.58 \pm 3.98 \%$ y $CE_{50} = 47.10 \pm 5.44 \mu\text{g/mL}$, mientras que el ácido adípico presentó valores de $E_{max} = 100 \pm 1.8 \%$ y una $CE_{50} = 451.10 \pm 11.12 \mu\text{g/mL}$. El control positivo, la acetilcolina relajó la aorta con una $E_{max} = 67.88 \pm 1.43 \%$ y una $CE_{50} = 9.30 \pm 1.14 \mu\text{g/mL}$. En la **Figura 7** se muestran las curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador de los

constituyentes mayoritarios en el extracto como: la afinina, el escualeno, el ácido adípico y la acetilcolina, esta última utilizada como control positivo.

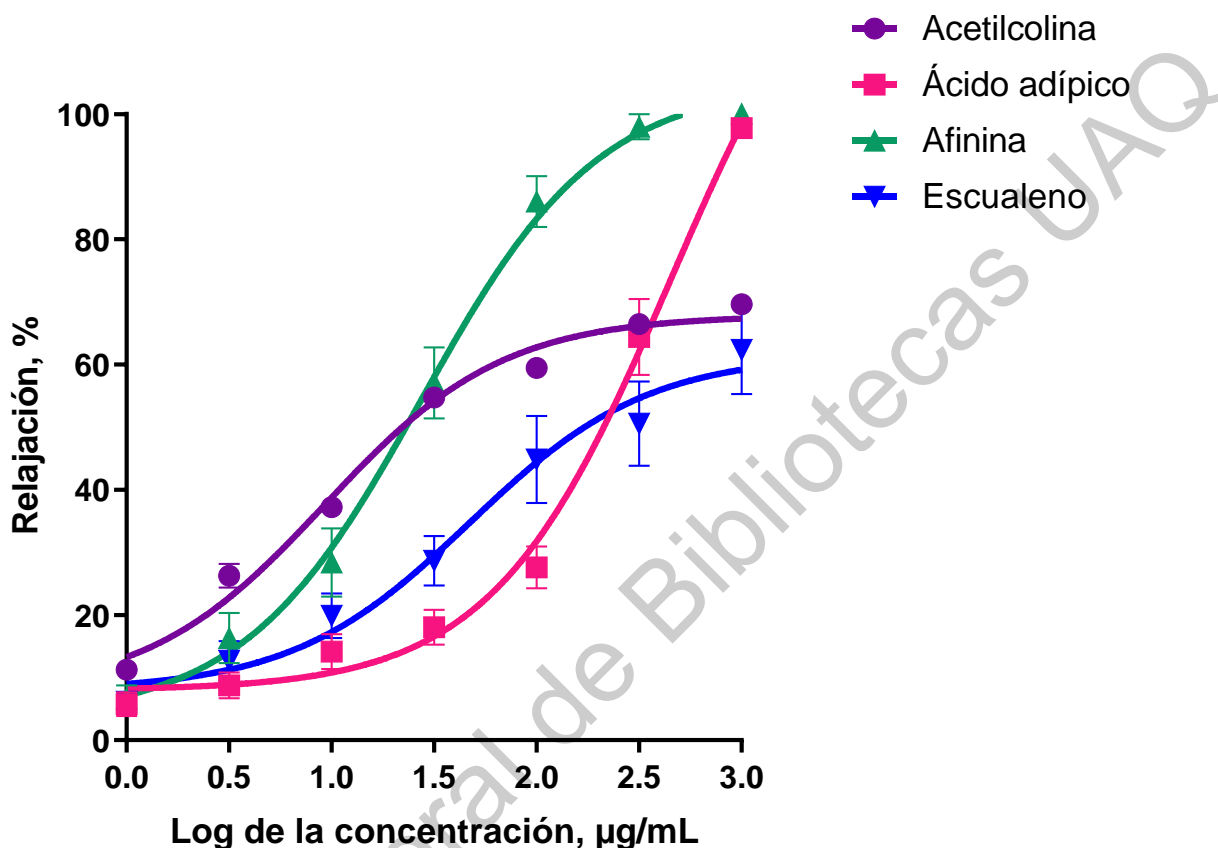


Figura 6. Curva concentración respuesta del efecto vasodilatador de los compuestos mayoritarios identificados por CG-MS.

Los estudios farmacológicos previamente realizados por nuestro grupo de trabajo sobre esta especie, demostraron que el EDMHI y la afinina, su componente mayoritario, poseen un efecto vasodilatador dependiente de la concentración con valores de $E_{max}=100 \pm 3.11\%$ y $CE_{50}= 76.99 \pm 1.14 \mu\text{g/mL}$ y $E_{max}= 100 \pm 3.10 \%$ y una $CE_{50}= 27.38 \pm 1.20 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Castro-Ruiz *et al.*, 2017). En el caso de la presente investigación, se encontró que el ácido adípico presentó un efecto máximo similar al del extracto crudo y al de la afinina, sin embargo, este compuesto presentó una potencia 5.85 y 16.47 veces menor a la del extracto y a la de la afinina, respectivamente. En el caso del escualeno, resulta interesante que

este terpeno presentó un efecto máximo comparable al del control positivo, la acetilcolina y, además, su efecto vasodilatador tuvo la mitad de la potencia de la vasodilatación inducida por la afinina.

Cabe destacar que, de los compuestos presentes en el extracto con actividad vasodilatadora, la afinina es el compuesto con mayor eficacia y potencia presente en el extracto de diclorometano de *H. longipes*. Es importante mencionar que el orto-metiltimol y el carvacrol, compuestos que nosotros identificamos en el EDMHI y que habían sido previamente identificados en la raíz de *H. longipes* (Aguilar *et al.*, 2016), ya habían demostrado poseer efecto vasodilatador con valores de $CE_{50} = 106.40 \pm 11.37$ y $CE_{50} = 145.40 \pm 6.07$, respectivamente (Aydin *et al.*, 2007; Peixoto-Neves *et al.*, 2010). En el **Cuadro 4**, se muestran los valores de CE_{50} y E_{max} de los compuestos vasodilatadores encontrados en la raíz de *H. longipes*.

Considerando los resultados obtenidos en este estudio y lo antes reportado, es posible considerar que el timol y el carvacrol podrían contribuir al efecto vasodilatador total del extracto crudo.

Cuadro 4. Efecto vasodilatador de los compuestos identificados en el extracto de diclorometano de *H. longipes*.

Compuesto	E_{max} (%)	CE_{50} (μ g/mL)	Referencia
Acetilcolina	67.88 ± 1.43	9.30 ± 1.14	Castro-Ruiz <i>et al.</i> , 2017
Ácido adípico	100 ± 1.8	451.10 ± 11.12	-
Afinina	100 ± 3.10	27.38 ± 1.20	Castro-Ruiz <i>et al.</i> , 2017
Carvacrol	ND	145.40 ± 6.07	Aydin <i>et al.</i> , 2007
Escualeno	61.58 ± 3.98	47.10 ± 5.44	-
Orto-metiltimol	ND	106.40 ± 11.37	Peixoto-Neves <i>et al.</i> , 2010

ND= No determinado

Con respecto al mecanismo vasodilatador inducido por compuestos presentes en la raíz de *H. longipes*, nuestro grupo de investigación ha encontrado evidencia que la afinina, posee un efecto vasodilatador parcialmente dependiente de endotelio. Los resultados sugieren que la activación de los canales TRPA1 podría ser el principal mecanismo involucrado en la respuesta vasomotora y que las vías de señalización de los gasotransmisores (NO, CO y H₂S) y de la prostaciclina, así como los

receptores a cannabinoides y los canales TRPV1, también contribuyen de manera importante al efecto vasodilatador inducido por la afinina (Castro-Ruiz *et al.*, 2017). De los monoterpenos, se ha reportado que el timol y el carvacrol inducen un efecto vasodilatador independiente de endotelio, el cual está mediado por mecanismos de transducción que inducen la liberación de Ca^{2+} a partir del retículo sarcoplásmico y/o por una regulación en la sensibilidad al Ca^{2+} del sistema contráctil (Aydin *et al.*, 2007; Peixoto-Neves *et al.*, 2010). No obstante, considerando la abundancia relativa de los compuestos en el extracto, la afinina, el compuesto con mayor abundancia relativa (46.1 %) podría ser la principal responsable del efecto vasodilatador de dicho extracto, ya que la abundancia relativa de los monoterpenos en dicho extracto es muy baja con un 0.83 %. Por otra parte, el ácido adípico y el escualeno se encuentran dentro de los compuestos con mayor abundancia relativa (0.96 %), por lo tanto, es posible que su efecto vasodilatador contribuya de manera significativa a la actividad biológica total del extracto crudo. Estos hallazgos apoyan el hecho de que el efecto biológico de una mezcla compleja, como un extracto, no puede atribuirse exclusivamente a un único compuesto, sino es el resultado aditivo o sinérgico y, a veces, antagónico de todos sus componentes.

10. CONCLUSIONES

El extracto de diclorometano se caracteriza principalmente por la presencia de alcanidas y abundantes terpenos.

El análisis por CG-MS permitió identificar 42 compuestos volátiles presentes en la raíz de *Heliopsis longipes* que no habían sido reportados anteriormente en esta especie.

El análisis por CG-MS permitió la identificación de dos metabolitos secundarios cuyo efecto vasodilatador se demostró por primera vez. Adicionalmente, se identificaron dos compuestos con actividad vasodilatadora ya reportada, los cuales podrían contribuir al efecto vasodilatador de este extracto.

El escualeno posee un efecto vasodilatador dependiente de la concentración en anillos aórticos de rata con una $E_{max} = 61.58 \pm 3.98 \%$ y una $CE_{50} = 47.10 \pm 5.44 \mu\text{g/mL}$ y el ácido adípico con una $E_{max} = 100 \pm 1.8 \%$ y una $CE_{50} = 451.10 \pm 11.12 \mu\text{g/mL}$.

Los resultados sugieren que el escualeno y el ácido adípico, en conjunto con la afinina, son los principales compuestos responsables de la actividad vasodilatadora del extracto crudo.

Los resultados obtenidos sugieren que el efecto vasodilatador del EDMHI es originado por el efecto aditivo o sinérgico de todos sus componentes.

11. PERSPECTIVAS

Evaluar el efecto vasodilatador de los compuestos con mayor abundancia relativa en el extracto, tales como la *N*-2-metilbutil-2E,6Z,8E-decatrienamida y el 9-cis, 11-trans-octadecadienoato de etilo.

Determinar el mecanismo de acción del efecto vasodilatador del ácido adípico y del escualeno.

Realizar un estudio metabolómico de las raíces de *Heliopsis longipes* a fin de determinar las variaciones en el perfil metabolómico, dependiendo de la etapa de desarrollo de la planta y la zona y la época de recolecta. Adicionalmente, correlacionar la actividad vasodilatadora con los perfiles metabolómicos que presenten las raíces de esta especie vegetal.

Seleccionar los marcadores químicos idóneos para la cuantificación y estandarización del extracto de la raíz de *Heliopsis longipes* y el posterior desarrollo de un fitomedicamento.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

12. REFERENCIAS

Acree, F., Jacobson, M., Haller, H. (1945). The structure of affinin, the insecticidal amide from *Frigeron affinis* D. C. *Journal of Organic Chemistry*, 10(5), 449–451.

Aguilar, M. I., Castillo, E. N., Alvarado-López, C., Duarte-Lisci, G., Ríos-Gómez, R., Rios, M. Y., (2016). HPLC determination of the alkamide affinin in fresh and dry roots of *Heliopsis longipes* (Asteraceae) and HS-SPME-GC-MS-TOF analysis of volatile components. *Food analytical methods*, 9:1807-1813.

Andrade-Castellanos, C. (2015). Hipertensión arterial primaria: Tratamiento farmacológico basado en la evidencia. *Medicina Interna de México*, 31(2), 191–195.

Avendaño-López, M. (2011). Natural products as sources of new drugs. A general overview. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 77(1), 12–26.

Aydin, Y., Kutlay, Ö., Ari, S., Duman, S., Uzuner, K., Aydin, S. (2007). Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta Medica*, 73(13), 1365–1371.

Barba, J. (2018). México y el reto de las enfermedades crónicas no transmisibles. El laboratorio también juega un papel importante. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 65(1), 4–17.

Bessada, S., Barreira, J., Oliveira, B. (2015). Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 604–615.

Blake, S. (1979). New American Asteraceae. *National Museum of Natural History*, 22(8), 587–661.

Bonnen, J., Baert, C., Burvenich, C., Blondeel, P., De Saeger, S., Spiegeleer, B. 2010. LC-MS profiling of N-alkylamides in *spilanthes acmella* extract and the transmucosal behavior of its main bioactive spilanthol. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53,243-249.

Brunton, L., Lazo, L., Parker, K. (2007). Fármacos que afectan las funciones renal y cardiovascular. Cap. 5. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Goodman y Gilman. Ed. *Mc Graw Hill Interamericana*, México. D.F., 737-953.

Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza-Tobías, A., Medina, C., Barquera, S. (2018). Hipertensión arterial en adultos mexicanos: prevalencia, diagnóstico y tipo de tratamiento. Ensanut MC 2016. *Salud Pública Mexicana*, 60(3), 233–243.

Cariño-Cortés, R., Gayosso-De-Lucio, J., Ortiz, M., Sánchez-Gutiérrez, P., García Reyna, P., Cilia-López, V., Pérez-Hernández, N., Moreno, E., Ponce-Monter, H. (2010). Antinociceptive, genotoxic and histopathological study of *Heliopsis longipes* S.F. Blake in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2), 216–221.

Castro-Ruiz, J., Rojas-Molina, A., Luna-Vázquez, F., Rivero-Cruz, F., García-Gasca, T., Ibarra-Alvarado, C. (2017). Affinin (Spilanthol), isolated from *Heliopsis longipes*, induces vasodilation via activation of gasotransmitters and prostacyclin signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 1–15.

Chagas-Paula, D., Zhang, T., Da Costa, F., Edrada-Ebel, R. (2015). A metabolomic approach to target compounds from the Asteraceae family for dual COX and LOX inhibition. *Metabolites*, 5(3), 404–430.

Cilia-López, V., Aguirre-Rivera, R., Espinosa-Reyez, G., Flores-Cano, J., Reyes-Agüero, A., Juárez-Flores, B. (2013). Distribución de *Heliopsis longipes* (Heliantheae: Asteraceae), un recurso endémico del centro de México. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 20(1), 47–53.

Cilia-López, V., Juárez-Flores, B., Aguirre-Rivera, J., Reyes-Aguero, J. (2010). Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system. *Pharmaceutical Biology*, 48(2), 195–200.

Córdova-Villalobos, J., Barriguete-Meléndez, J., Lara-Esqueda, A., Barquera, S., Rosas-Peralta, M., Hernández-Ávila, M., De León-May, M., Aguilar-Salinas, C. (2008). Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: Sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud Pública de México*, 50(5), 419–427.

De-an, G., Wan-Ying, W., Min, Y., Xuan, L., Geoffrey, A. (2015). The art and science of traditional medicine part 2: Multidisciplinary approaches for studying traditional medicine. *Science*, 347(6219), 337–337

Déciga-Campos, M., Arriaga-Alba, M., Ventura-Martínez, R., Aguilar-Guadarrama, B., Rios, M. (2012). Pharmacological and toxicological profile of extract from *Heliopsis longipes* and affinin. *Drug Development Research*, 73(3), 130–137.

Dehghan, E., Goodarzi, M., Saremi, B., Lin, R., Mirzaei, H. (2019). Hydralazine targets cAMP-dependent protein kinase leading to sirtuin1/5 activation and lifespan extension in *C. elegans*. *Nature Communications*, 10(1), 4905.

Delgado-Altamirano, R., López-Palma, R. I., Monzote, L., Delgado-Domínguez, J., Becker, I., Rivero-Cruz, J. F., Esturau-Escofet, N., Vázquez-Landaverde, P. A., Rojas-Molina, A. (2019). Chemical constituents with Leishmanicidal Activity from a Pink-Yellow Cultivar of *Lantana camara* var. *aculeata* (L) Collected in Central Mexico. *International Journals of Molecular Sciences*, (20): 872.

Dominguez, X. A. (1982) Cromatografía en papel y capa delgada. Serie química, monografía 16. Washington, Distrito de Columbia, Estados Unidos. *Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos*

Düsing, R., Waeber, B., Destro, M., Santos, C., Brunel, P. (2017). Triple-combination therapy in the treatment of hypertension: A review of the evidence. *Journal of Human Hypertension*, 31(8), 501–510.

Ferrari, R., Di Pasquale, G., Rapezzi, C. (2020). 2019 CORONAVIRUS: What are the implications for cardiology? *European Journal of Preventive Cardiology*, 27(8), 793–796.

Ferro, E. (2015). Productos naturales como fuente de moléculas con actividad biológica. *Memorias Del Instituto de Investigaciones en Ciencias de La Salud*, 13(2), 04–05.

Fong, H. (2002). Integration of herbal medicine into modern medical practices: Issues and prospects. *Integrative Cancer Therapies*, 1(3), 287–293.

Food and Drug Administration (2011). Guidance for industry. Hypertension indication: drug labeling for cardiovascular outcome claims. *Center for Drug Evaluation and Research*, 9(10), 1–12.

Forouzanfar, M., Liu, P., Roth, G., Ng, M., Biryukov, S., Marczak, L., Alexander, L., Estep, K., Hassen, K., Akinyemiju, T., Ali, R., Alvis-Guzman, N., Azzopardi, P., Banerjee, A., Bärnighausen, T., Basu, A., Bekele, T., Bennett, D., Biadqiliqn, S., Catalá-López, F., Feigin, V., Fernandes, J., Fischer, F., Gebru, A., Gona, P., Gupta, R., Hankey, G., Jonas, J., Judd, S., Khang, Y., Khosravi, A., Kim, Y., Kimokoti, R., Kokubo, Y., López, A., Lotufo, P., Malekzaden, R., Melaku, Y., Mensah, Y., Misganaw, A., Mokdad, A., Moran, A., Nawas, H., Neal, B., Ngalesoni, F., Ohkubo, T., Pourmalek, F., Rafay, A. (2017). Global burden of hypertension and systolic blood pressure of at least 110 to 115 mm Hg, 1990-2015. *Journal of the American Medical Association*, 317(2), 165–182.

García-Aguilar, L., Rojas-Molina, A., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, J., Vázquez-Landaverde, P., Luna-Vázquez, F., Zavala-Sánchez, M. (2015). Nutritional value and volatile compounds of black cherry (*prunus serotina*) seeds. *Molecules*, 20(2), 3479–3495.

García-Chávez, A., Ramírez, E., Molina-Torres, J. (2004). El género *Heliopsis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las alcanidas presentes en sus raíces. *Acta Botánica Mexicana*, 131(69), 115.

García-Sánchez, C., Sánchez-González, A., Villaseñor, J. (2014). Familia Asteraceae en el parque Nacional los Mármoles, Hidalgo, México. *Acta Botánica Mexicana*, 106, 97–116.

Giannopoulos, A., Giannoglou, G., Chatzizisis, Y. (2016). Pharmacological approaches of refractory angina. *Pharmacology and Therapeutics*, 163, 118–131.

Gutiérrez-Lugo, M., Barrientos-Benítez, T., Luna, B., Ramirez-Gamma, R., Bye, R., Linares, E., Mata, R. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican medicinal plants. *Phytomedicine*, 2(4), 341–347.

Gutiérrez-Román, A., González-Cortazar, M., Trejo-Tapia, G., Herrera-Ruiz, M., Zamilpa, A., Sánchez-Mendoza, E., Cruz-Sanchez, N., Jiménez-Ferrer, E. (2020). Angiotensin-converting enzyme inhibitors from *Salvia elegans* Vahl. *Natural Product Research*, 1–6.

Hernández, A. (2005). Fitoterapia. Bases científicas y legales para su aplicación. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 4(4), 71-74.

Hernández, I., Lemus, Y., Prieto, S., Molina-Torres, J., Garrido, G. (2009). Anti-inflammatory effect of an ethanolic root extract of *Heliopsis longipes* *in vitro*. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(3), 160–164.

Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A., Mendoza, S., Bah, M., Gutierrez, D. (2010). Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmaceutical Biology*, 48(7), 732–739.

Jakupovic, J., Schuster, A., Chau-thi, T. V., Bohlmann, F., Dominguez, X. A., (1987) Guaianolides and homoditerpenes from *Heliopsis helianthoides*. *Phytochemistry*, 27(7), 2235-2240.

Knox, M., Vinet, R., Fuentes, L., Morales, B., Martínez, J. (2019). A review of endothelium-dependent and-independent vasodilation induced by phytochemicals in isolated rat aorta. *Animals*, 9(9), 1–19.

López-Martínez, S., Aguilar-Guadarrama, B., Rios, M. (2011). Minor alkaloids from *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) fresh roots. *Phytochemistry Letters*, 4(3), 275–279.

Lorenzo, P., Moreno, L., Lizasoain, J., Leza, M., Moro, A. (2008). Aparato cardiovascular. Cap. 4. En: Farmacología Básica y Clínica. Velázquez. Ed. *Médica Panamericana*, Madrid. Buenos Aires. 355–455.

Maicas, C., Lázaro, E., Alcalá, P., Hernández, P., Rodríguez, L., (2003). Etiología y fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. *Monocardio*, 5(3), 141–160.

Molina-Torres, J., Salgado-Garciglia, R., Ramírez-Chávez, E. (1995). Presence of the bornyl ester of deca-2e,6z,8e-trienoic acid in *Heliopsis longipes* roots. *Journal of Natural Products*, 58(10), 1590–1591.

Molina-Torres, J., Salgado-Garciglia, R., Ramírez-Chávez, E. (1999). Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: Affinin and capsaicin. *Journal of Ethnopharmacol*, 64(3), 241-8.

Molina-Torres, J., Salgado-Garciglia, R., Ramírez-Chávez, E., Del Rio, R. (1996). Purely olefinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *acmella* (*Spilanthes oppositifolia*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 24(1), 43–47.

Newman, D. y Cragg, G. (2020). Natural products as sources of new over the nearly four decades from 01/71981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83, 770-803.

Ocegueda, S., Moreno, E., Koleff, P. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *Diversitas*, 62, 12–15.

Oparil, S., Zaman, A., Calhoun, D. (2003). Review pathogenesis of hypertension. *Physiology in Medicine*, 139, 761–776.

Organización Mundial de la Salud. (2013a). Información general sobre la hipertension en el mundo (1st ed., Vol. 1). *Organización Mundial de la Salud*.

Organización Mundial de la Salud. (2013b). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional (1st ed.). *Organización Mundial de la Salud*.

Organización Panamericana de la Salud. (2019). Plan de acción para la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles en las Américas 2013-2019 (1st ed., Vol. 1). *Organización Mundial de la Salud*.

Parola-Contreras, I., Tovar-Perez, E. G., Rojas-Molina, A., Luna-Vázquez, F. J., Torres-Pacheco, I., Ocampo-Velazquez, R. V., Guevara-Gonzalez, R. G (2020). Changes in affinin contents in *Heliopsis longipes* (Chilguague) after a controlled elicitation strategy under greenhouse conditions. *Industrial Crops and Products*, 148: 112314.

Peixoto-Neves, D., Silva-Alves, K. S., Gomes, M. D. M., Lima, F. C. Lahlou, S., Magalhães, P. J. C., Ceccatto, V. M., Coelho-de-Souza, A. N. (2009). Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, (24) 341-350.

Prieto-González, S., Garrido-Garrido, G., González-Lavaut, J., Molina-Torres, J. (2004). Actualidad de la medicina tradicional herbolaria. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 35(1), 19–36.

Ramírez-Chávez, E., Lucas-Valdez, L., Virgen-Calleros, G., Molina-Torres, J. (2000). Fungicidal activity of afinnin and *Heliopsis longipes* crude root extract on two *Sclerotium* species. *Agrociencia*, 34(2), 207–215.

Ren-Ren, B., Xiao-Ming, W., Jin-Yi, X. (2015). Current natural products with antihypertensive activity. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(10), 721–729.

Reyes, J. Zarain, A. (2006). Función del retículo sarcoplásmico y su papel en las enfermedades cardíacas. *Archivos de Cardiología de México*, 76(4), 18–32.

Rosas-Peralta, M., Palomo-Piñón, S., Borraro-Sánchez, G., Madrid-Millera, A., Almeida-Gutiérrez, E., Galván-Ocegueda, H., Magaña-Serrano, J., Díaz-Díaz, E., Salgado-Pastor, J., Morales-Mora, G., Medina-Concebida, L., Mejía, O., Pérez-Ruiz, E., Chapa, L., Álvarez, C., Pérez-Rodríguez, G., Castro-Martínez, G., López-Bárcena, J., Paniagua-Sierra, R. (2016). Consenso de hipertensión arterial sistémica en México. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 54(1), S6-51.

Sanz-Rosa, D. (2011). Los receptores β adrenérgicos en la enfermedad cardiovascular. *Hipertensión y Riesgo Vascular*, 28(2), 55–62.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2016). Informe de la situación del medio ambiente en México. Compendio de las estadísticas ambientales. Indicadores clave, de desempeño ambiental y de crecimiento verde. *SEMARNAT*.

Secretaría de Salud (2018). Panorama epidemiológico 2018 Enfermedades no transmisibles: Observatorio Mexicano de enfermedades no transmisibles (OMENT). *Secretaría de Salud*.

Sica, D. (2004). Minoxidil: an underused vasodilator for resistant or severe hypertension. *Journal of Clinical Hypertension*, 6(5), 283–287.

Sinha, A. y Agarwal, R. (2019). Clinical pharmacology of antihypertensive therapy for the treatment of hypertension in CKD. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 14(5), 757–764.

Sistema Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agropecuaria y Alimentaria. (2001). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación*.

Stratton, C., Newman, D., Tan, D. (2015). Cheminformatic comparison of approved drugs from natural product versus synthetic origins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 25(21), 4802–4807.

Uzuner, H., Bauer, R., Tai-Ping, F., De-an, G., Dias, A., El-Nezamif, H., Thomas, E., Williamson, M., Heinrich, M., Robinson, N., Hylands, P., Hendry, B., Yung-Chi, C., Qihe, X. (2012). Traditional Chinese medicine research in the post-genomic era: Good practice, priorities, challenges and opportunities. *Journal of Ethnopharmacology*, 140(3), 458–468.

Vanegas, A. (2017). Una visión histórica en el desarrollo de fármacos a partir de productos naturales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 48(3), 16–27.

Villarreal-Ibarra, E., Lagunes, L., López, P., García-López, E., Palma, D., Ortiz-García, C. (2015). Evaluación etnofarmacológica de plantas con propiedades hipoglucémicas usadas en la medicina tradicional del sureste de México. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(2), 99–112.

Villaseñor, J. L. (2016). Catálogo de las plantas vasculares nativas de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3), 559–902.

Zsanett, H., Nicolussi, S., Rau, M., Lorántfy, L., Forgo, P., Hohmann, J., Csupor, D., Gertsch, J. (2014) Identification of endocannabinoid system-Modulating *N*-alkylamides from *Heliopsis helianthoides* var. *Scabra* and *Lepidum meyenii*. *Journal of Natural Products*, 77(7), 1663-9.

Dirección General de Bibliotecas UAQ