

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

“CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD VASODILATADORA DE CONSTITUYENTES QUÍMICOS
DE FRACCIONES POLARES DEL EXTRACTO METANÓLICO DE
LAS HOJAS DE *Crataegus rosei*”

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER
EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. TANIA NATIVIDAD MARTÍNEZ GARNICA

DIRIGIDA POR:

DR. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

QUERÉTARO
FEBRERO DE 2023
MÉXICO



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Caracterización química y evaluación de la actividad
vasodilatadora de constituyentes químicos de las
fracciones polares del extracto metanólico de las hojas
de *Crataegus rosei*

por

Tania Natividad Martínez Garnica

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQMAC-300254-0323-223



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

“CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
VASODILATADORA DE CONSTITUYENTES QUÍMICOS DE FRACCIONES POLARES
DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Crataegus rosei*”

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. TANIA NATIVIDAD MARTÍNEZ GARNICA

DIRIGIDA POR:

DR. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

COMITÉ TUTORAL

Dr. Mamadou Moustapha Bah
Presidente

Dr. César Ibarra Alvarado
Secretario

Dr. José Alejandro García Arredondo
Vocal

Dr. Eloy Rodríguez De León
Suplente

Dr. Miguel Ángel Ramos López
Suplente

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Febrero de 2023
México

“Ningún proyecto prospera si no hay buena dirección;
los proyectos que alcanzan el éxito son los que están bien dirigidos”

Proverbios 15:22 (TLA)

*Dedico este trabajo a mi abuelito
José Pilar Martínez Maqueda (1944-2022),
quien perdió la batalla contra el EPOC.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme fuerza y haberme permitido vivir hasta el día de hoy. Gracias por el conocimiento otorgado, por ser guía y escudo alrededor de mí.

A mis padres Samuel y Yolanda Martínez quienes han sido pilares tanto en mi vida personal como en mi vida académica, sin ustedes no podría haberlo logrado. Gracias por inspirarme a ser mejor que ayer y a animarme a obtener lo que me propongo.

A mi amado esposo Isidro Herrera por todo el apoyo brindado para llevar a cabo este trabajo, por darme a una hermosa hija quien ha sido mi motor e inspiración desde el día que nació.

A la familia Martínez Melchor por ser luz en mi vida. Gracias por toda la confianza, las oraciones y el apoyo brindado.

A mis pastores José Luis y Elda Montaña por sus oraciones, amor y apoyo.

A mi amiga incondicional Luna, quien me acompañó cuando más la necesitaba. Gracias por haber viajado cada fin de semana desde Morelia a Querétaro sin importar los obstáculos o situaciones incómodas que se presentaban.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Facultad de Ciencias Químicas y al Posgrado de Ciencias Químico Biológicas; así como a mis profesores, en especial al Dr. Moustapha Bah, por recibirme en su equipo de trabajo. Gracias por abrirme las puertas para crecer académicamente, por la confianza, el apoyo y toda la paciencia que me tuvo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo de manutención otorgado durante mis estudios y por el proyecto de investigación

titulado “Mantenimiento de la infraestructura científica de los laboratorios del área de Ciencias Químico Biológicas que apoyan actividades de investigación y docencia en los niveles de licenciatura y posgrado en la Universidad Autónoma de Querétaro” (proyecto 316849) del Fondo de Desarrollo Científico 2 (FOP02-2021-04).

A cada uno de los miembros de mi comité tutorial: Dr. César Ibarra, Dr. Alejandro García, Dr. Eloy Rodríguez y Dr. Miguel Ángel Ramos, por el tiempo invertido en las evaluaciones y revisiones; así como las valiosas aportaciones realizadas al proyecto.

A la Dra. Leticia García y a la M. C. Dailenys Marrero por el apoyo brindado en la realización de los ensayos farmacológicos.

Finalmente, a cada uno de mis compañeros, en especial al M. C. Manuel Álvarez y a la M. C. Valerie Tinoco por su apoyo y amistad, ustedes hicieron más ligero los últimos dos años.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE GENERAL	VII
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Plantas medicinales mexicanas	3
2.2. Género <i>Crataegus</i>	3
2.2.1. Botánica y taxonomía	6
2.2.2. Propiedades farmacológicas y metabolitos secundarios característicos	7
2.3. Extractos vegetales estandarizados	14
2.3.1. Generalidades	14
2.3.2. Extractos estandarizados del género <i>Crataegus</i>	14
2.4. Enfermedades cardiovasculares (ECV)	15
2.4.1. Principales enfermedades cardiovasculares	16
2.4.1.1. Hipertensión arterial (HTA)	16
2.4.1.2. Cardiopatía isquémica	17
2.4.1.3. Angina de pecho	18
2.4.1.4. Infarto agudo al miocardio (IAM)	18
2.5. Estudios químicos de metabolitos secundarios	20
2.5.1. Métodos de separación e identificación de metabolitos secundarios	20
2.5.1.1. Cromatografía en capa fina (CCF)	20

2.5.1.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	21
2.5.2. Métodos de identificación	21
2.5.2.1. Espectrometría de masas	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	24
5.1. General	24
5.2. Específicos	24
6. METODOLOGÍA	25
6.1. Obtención de las fracciones objeto de estudio	25
6.2. Evaluación farmacológica	25
6.2.1. Modelo experimental	25
6.2.2. Preparación de las fracciones	25
6.2.3. Ensayo farmacológico <i>ex vivo</i> en aorta de rata	26
6.3. Análisis estadístico en los ensayos farmacológicos	27
6.4. Estudio químico	27
6.4.1. Métodos de separación y purificación	27
6.4.1.1. Cromatografía en capa fina (CCF)	27
6.4.1.2. Cromatografía de líquidos	28
6.4.1.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de arreglo de Diodos (HPLC-DAD)	28
6.4.1.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC-EM)	30
6.4.1.5. Cromatografía en columna abierta (CC)	31
6.5. Hidrólisis ácida de la mezcla de las fracciones 406-408	31
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
7.1. Estudios químicos	33

7.1.1. Hidrólisis ácida de la mezcla de las fracciones 406-408	33
7.2. Análisis de las fracciones individuales 406, 407 y 408 mediante HPLC-DAD	34
7.3. Análisis de la mezcla de las fracciones 406 y 407 mediante HPLC-EM	38
7.4. Fraccionamiento por CC de la mezcla de las fracciones 406-408	39
7.4.1. Análisis cromatográfico de las fracciones colectadas mediante CCF	40
7.4.2. Análisis de las fracciones secundarias mediante HPLC-EM	41
7.5. Evaluación farmacológica de las fracciones	45
8. CONCLUSIONES	49
9. REFERENCIAS	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Principales flavonoides aislados de <i>Crataegus</i>	8
2	Principales causas de muerte en México	16
3	Fármacos antihipertensivos de acuerdo con su mecanismo de acción	17
4	Método 1 utilizado para la identificación de flavonoides en la mezcla de las fracciones 406-408	29
5	Método 2 utilizado para la identificación de flavonoides en la mezcla de las fracciones 406-408	29
6	Condiciones para el análisis de la mezcla de las fracciones 406 y 407 mediante HPLC-EM	30
7	Compuestos identificados mediante la comparación de las TR de los picos de la muestra con los de los estándares	33
8	Fracciones colectadas y agrupadas de la cromatografía en CC	40
9	Compuestos identificados de la mezcla de las fracciones secundarias 164-183 mediante HPLC-EM	43
10	Valores de E_{max} (% relajación) y CE_{50} de la acetilcolina (ACh) y del extracto metanólico libre de grasa y taninos (EMLGT)	46
11	Valores de E_{max} (% relajación) y CE_{50} de la acetilcolina (ACh), del extracto metanólico libre de grasa y taninos (EMLGT) y de la mezcla de las fracciones 406-408	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Distribución geográfica de especies mexicanas de <i>Crataegus</i>	4
2	Frutos del género <i>Crataegus</i>	5
3	Flores y frutos de <i>Crataegus mexicana</i>	6
4	Esqueleto básico de los flavonoides	10
5	Características estructurales de los principales tipos de flavonoides	11
6	Flavonoides más abundantes en las hojas de <i>Crataegus</i>	12
7	Estructuras de los ácidos triterpénicos caracterizados en las hojas de <i>C. rosei</i>	13
8	Extracto estandarizado WS [®] 1442	15
9	Tipos de IAM	19
10	Cromatograma HPLC del producto de hidrólisis ácida de la mezcla de las fracciones 406-408	33
11	Cromatograma HPLC de la fracción 406 del extracto metanólico de las hojas de <i>Crataegus rosei</i>	35
12	Cromatograma HPLC de la fracción 407 del extracto metanólico de las hojas de <i>Crataegus rosei</i>	35
13	Cromatograma HPLC de la mezcla de las fracciones 406 y 407	36
14	Cromatograma HPLC de la fracción 408 del extracto metanólico de las hojas de <i>Crataegus rosei</i>	37
15	Cromatograma HPLC de la mezcla de las fracciones 406-408	37
16	Cromatograma HPLC-EM de la mezcla de las fracciones 406 y 407	38
17	CCF de las fracciones 164 a la 205	41
18	Compuestos identificados en la mezcla de las fracciones 164-183 mediante HPLC-EM	42

19	Curvas concentración-respuesta del ensayo farmacológico (mezcla de las fracciones 406 y 407)	46
20	Curvas concentración-respuesta del ensayo farmacológico (mezcla de las fracciones 406-408)	47

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

A nivel mundial, las plantas medicinales se han empleado para tratar diversos padecimientos, incluyendo las enfermedades cardiovasculares (ECVs). Entre esas enfermedades, la hipertensión es el factor de riesgo más importante, ya que, sin tratamiento, desencadena la mayoría de las demás. Las ECVs en su conjunto, constituyen la primera causa de fallecimientos, tanto en México, como a nivel global. Las plantas del género *Crataegus* se han utilizado en la medicina tradicional de diferentes países para tratar las ECV. Algunos países de Asia, Europa, así como Canadá y Estados Unidos, han elaborado extractos estandarizados con estas especies vegetales que se utilizan actualmente a nivel clínico. Dichos extractos han sido estandarizados, utilizando como marcadores químicos, principalmente compuestos fenólicos (flavonoides y sus derivados), que son compuestos con alta polaridad. México alberga al menos 15 especies del género *Crataegus* bien identificadas, la mayoría de las cuales son endémicas. Sin embargo, a pesar de sus usos tradicionales como alimento y como medicinal, son muy escasos los estudios químicos y farmacológicos de esas plantas. Por esta razón, el presente proyecto abordó el estudio del perfil químico y de la actividad vasodilatadora de las fracciones polares del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei*, las cuales se obtuvieron del fraccionamiento primario del extracto original. Para lograr esos objetivos, las fracciones seleccionadas fueron analizadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), de la cual se logró la identificación de 13 de sus constituyentes individuales. Finalmente, la evaluación de la actividad vasodilatadora de las fracciones, utilizando el ensayo de aorta aislada de rata, arrojó como resultado un comportamiento bifásico, a diferencia del extracto original, produciendo un efecto de relajación en concentraciones menores a 30 $\mu\text{g/mL}$ y mayores a 400 $\mu\text{g/mL}$, mientras que contrae en ese intervalo. Por lo tanto, sería recomendable administrar a un paciente el extracto completo, en línea con el uso tradicional de esta especie vegetal para el tratamiento de la hipertensión arterial, después de llevar a cabo estudios de inocuidad.

Palabras clave: *Crataegus rosei*, fracciones polares, perfil químico, actividad vasodilatadora.

ABSTRACT

Medicinal plants have been used throughout the world to treat different health conditions, including cardiovascular diseases (CVDs). Among these last ones, hypertension is the main risk factor, as is left untreated, it can trigger most of the other CVDs, which all together are the main cause of deaths, both in Mexico and in the rest of the world. Plants belonging to the genus *Crataegus* have been used traditionally in different countries to treat CVD. Nowadays, some Asian and European countries as well as United States and Canada, have manufactured *Crataegus* standardized extracts, which are currently in use at the clinical level. These extracts have been standardized using the highly polar phenolic compounds (flavonoids and their derivatives) as the chemical markers. Mexico holds 15 fully identified species of the genus *Crataegus*, most of which are endemic. However, despite their traditional medicinal and food uses, few chemical and pharmacological studies of these plants have been undertaken. The current project aimed to generate basic knowledge on the chemical profile and vasorelaxing effect of the most polar fractions resulting from the primary fractionation of the methanol extract of the leaves of *C. rosei*. To achieve these goals, the selected fractions were subjected to HPLC, from which 13 of their compounds were identified. Finally, assessment of the vasodilator activity of the fractions, using isolated rat aorta, resulted in biphasic behavior, in contrast to the methanol extract from which they originate, as they produced vasorelaxing effect under 30 $\mu\text{g/mL}$ and above 400 $\mu\text{g/mL}$, but relaxation between these concentrations. So it is advisable to give a patient the whole methanol extract after careful safety studies, in accordance with the traditional use of this plant species for the treatment of arterial hypertension.

Keywords: *Crataegus rosei*, polar fractions, chemical profile, vasodilator activity.

1. INTRODUCCIÓN

Estadísticas de la OMS y del INEGI sitúan las enfermedades cardiovasculares (ECV) en todas sus manifestaciones como las principales causantes de muerte en el mundo y en México, por debajo del COVID-19. Entre esas enfermedades, la hipertensión arterial (HTA) es hoy en día el padecimiento silencioso más difundido y constituye el factor de riesgo predominante para el desarrollo de las demás ECV, lo cual ha sido corroborado mediante estudios observacionales de amplias cohortes y clínicos (INEGI, 2021; OMS, 2020). Existen numerosos fármacos para tratar la HTA. La mayoría de estos medicamentos son fáciles de tomar, sin embargo, algunos de ellos tienen efectos secundarios como tos, diarrea o estreñimiento, vértigo, problemas de erección, sentirse nervioso, cansado, débil, soñoliento o con falta de energía, dolor de cabeza, náuseas o vómitos, erupción cutánea y/o pérdida o aumento de peso sin proponérselo (MedlinePlus).

Dentro del continente americano, Brasil tiene la mayor diversidad en flora, con 33,161 especies, seguido por Colombia (23,104) y México (22,969) (Ulloa y col., 2017). En nuestro país, existen alrededor de 23,000 plantas, de las cuales se considera que más del 50% son endémicas (Tellez y col., 2020). Existen documentos escritos donde se recopilan diferentes plantas, siendo el “*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*” el primer libro publicado en América, mejor conocido como “el códice De la Cruz-Badiano”, el cual fue elaborado en 1552 por dos autores, Martín de la Cruz, quien lo escribió originariamente en náhuatl y Juan Badiano, quien lo tradujo al latín. Este códice es el libro más antiguo sobre la herbolaria de México; describe 251 plantas en 30 capítulos y 185 ilustraciones a color (Hernández-Ramírez, 2020).

De las plantas medicinales, se pueden utilizar sus raíces, sus tallos, sus hojas, etc. y comúnmente son administradas en infusiones o en polvos. En estas infusiones, los compuestos contenidos en las plantas se solubilizan y así llegan al órgano diana (INIFAP, 2020). Dichos compuestos son químicamente conocidos como metabolitos

secundarios, los cuales comprenden principalmente alcaloides, terpenos y compuestos fenólicos (flavonoides y no flavonoides) (Rocha-Salavarieta, 2006).

En el tejocote se han identificado diversos tipos de compuestos que son capaces de prevenir diversas enfermedades; sin embargo, los compuestos fenólicos parecen ser los responsables de los efectos benéficos para la salud atribuidos al género *Crataegus*. Sólo algunos de estos efectos benéficos o protectores han sido plenamente demostrados (Cervantes-Paz y col., 2018).

Las plantas del género *Crataegus* se utilizan con fines medicinales y alimenticios a nivel mundial. En México, existen 15 especies de este género (Núñez-Colín y col., 2008a). Sin embargo, pocas de ellas han sido estudiadas desde el punto de vista químico y farmacológico.

De las especies estudiadas de este género, se ha comprobado que los compuestos, contenidos en ellas ayudan a mejorar la circulación sanguínea, disfunción miocárdica, aterosclerosis, dislipidemia, hipotensión, angina de pecho, arritmias e insuficiencia cardíaca (Dong y col., 2017).

Los estudios realizados hasta el día de hoy demuestran que el extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei* es un potente vasorrelajante en aorta aislada de rata. Sin embargo, sólo han sido identificados cuatro triterpenos en fracciones no polares (López-Fitz, 2019). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es caracterizar químicamente y determinar la actividad vasodilatadora de las fracciones más polares del extracto metanólico de las hojas de esta planta.

2. ANTECEDENTES

2.1. Plantas medicinales mexicanas

A finales del siglo XX, la Organización Mundial de la Salud (OMS) valoró la importancia de la medicina tradicional de países con culturas originarias como son China, India y México, en donde amplios sectores de la población, sobre todo los de escasos recursos, hacen uso de ella. Esta valoración propició que, en nuestro país, las autoridades de la Secretaría de Salud reconocieran a la medicina tradicional oficialmente y promovieran su uso (Ávila-Uribe y col., 2016).

De acuerdo con la OMS, el término “enfermedad” significa la “Alteración o desviación del estado fisiológico en una o varias partes del cuerpo, por causas en general conocidas, manifestada por síntomas y signos característicos, y cuya evolución es más o menos previsible” (OMS, 2019).

De las casi 23,000 especies de plantas registradas en México, se calcula que al menos el 50% se utiliza para satisfacer alguna necesidad humana y las plantas medicinales ocupan el principal porcentaje (Gheno-Heredia y col., 2011). Según Alonso (2003), se estima que, en México, la validación química, farmacológica y biomédica sólo se había llevado a cabo en alrededor del 5% de estas especies. A pesar de que desde ese año se han realizado estudios de otras plantas para aportar más datos, es poco probable que esa proporción haya variado de manera significativa.

2.2. Género *Crataegus*

El género *Crataegus* pertenece a la familia Rosaceae, subtribu Pyrinae, lo que formalmente constituye la subfamilia Maloideae. El número de miembros que integran este género ha sido de los más difíciles para determinar y por lo tanto de los más polémicos, debido a la alta hibridación que experimentan. Se ha asumido que el género está constituido aproximadamente de 150 especies dispersas en todo el mundo, de las cuales 95 de ellas se encuentran en el continente americano y de estas, alrededor de 15 en México (López-Santiago y col., 2008). Sin embargo,

recientemente, se ha sostenido que existen cerca 1000 especies de este género (Alirezalu y col., 2020).

“Tejocote” es el nombre por el cual se conocen las plantas del género *Crataegus* en México. La palabra “Tejocote” se deriva del vocablo náhuatl “Texocotl” que significa fruta ácida y dura. El fruto del tejocote ha sido empleado tradicionalmente en México desde tiempos prehispánicos. Las plantas de este género se encuentran distribuidas principalmente en los estados de México, Puebla, Tlaxcala, Chiapas, Michoacán, Hidalgo y Morelos. El Estado de México es uno de los tres principales productores de tejocote a nivel nacional. En este estado, existe una vasta región con zonas templadas, las cuales constituyen una reserva de amplia variabilidad genética para el género *Crataegus* (Núñez-Colín y col., 2012) (**Figura 1**).

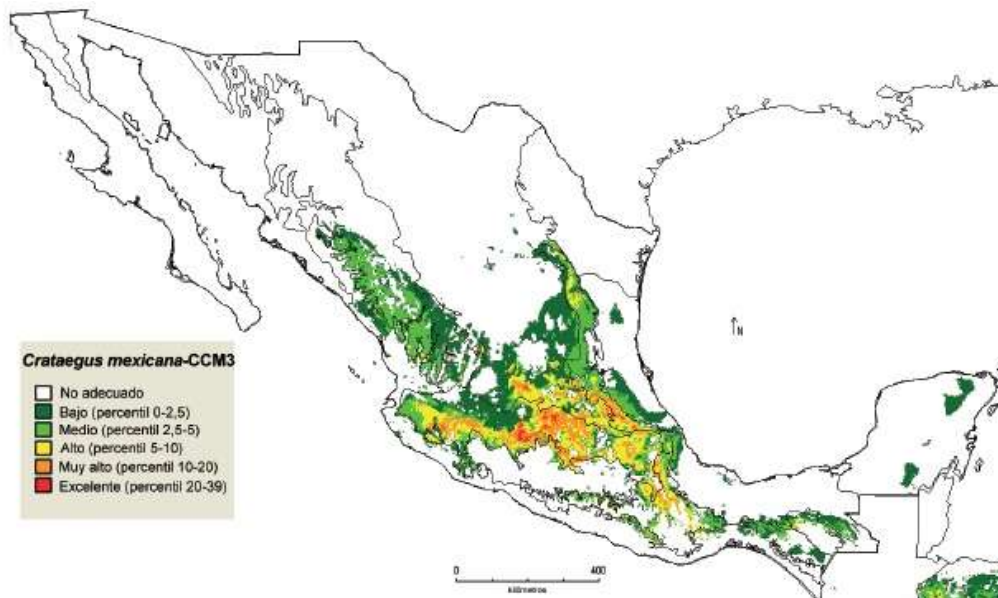


Figura 1. Distribución geográfica de especies mexicanas de *Crataegus* (Núñez-Colín y col., 2012).

El tejocote es apreciado preferentemente en épocas navideñas, debido a su empleo en la elaboración del ponche, bebida tradicional asociada con las posadas mexicanas. Tiene un fruto (**Figura 2**) rico en vitamina C, carotenos y sales

minerales, entre ellas el calcio, fósforo, hierro, y presenta un alto contenido de pectina (Pérez-Lainez y García-Mateos, 2014). Cabe mencionar que el color de este varía dependiendo de la especie (Alirezalu y col., 2020).



Figura 2. Frutos del género *Crataegus* (Alirezalu y col., 2020).

Además, el fruto, la raíz y las hojas del tejocote se han empleado tradicionalmente para aliviar diversas enfermedades humanas, entre ellas, padecimientos del corazón, del sistema respiratorio y del urinario. Frutos y flores del género *Crataegus* presentan constituyentes con potencialidad antioxidante, entre ellos los ácidos epicatéquico y clorogénico (Franco-Mora y col., 2010).

En la Unión Europea, *Crataegus monogyna* es reconocida por su uso tradicional para aliviar síntomas de molestias cardíacas temporales como palpitaciones, latidos cardíacos adicionales percibidos debido a ansiedad leve y para el alivio de síntomas leves de trastorno mental, estrés y para ayudar a dormir (Abuashwashi y col., 2016).

2.2.1. Botánica y taxonomía

Crataegus es un árbol (o arbusto) que alcanza una altura hasta de 9 metros. Las hojas del árbol de tejocote son coriáceas, verdes brillantes, oblongas y con pilosidad en el envés. Sus ramas tienen espinas y producen flores pentapétalas blancas de unos 5 a 7 cm de diámetro, más raramente rosadas (**Figura 3 A**). Estas flores aparecen en primavera o verano y sus frutos son comestibles de color amarillo a negro rojizo (dependiendo la especie), cuando están maduros miden alrededor de 1 a 2 cm de diámetro (**Figura 3 B**). Dado que estos frutos permanecen en el árbol durante el invierno, le imparten coloraciones muy decorativas durante esta estación (Muñoz-Garmendia y col., 1992).



Figura 3. A) Flores y **B)** frutos de *Crataegus mexicana* (www.revivemx.org).

En 1997, Phipps reportó 13 especies del género *Crataegus* distribuidas en el norte y centro de México y dos especies en el sur de México; de las 15 especies reconocidas hoy en día, 11 son endémicas. Las especies mexicanas del género se dividen en seis series taxonómicas: Mexicanee (*C. mexicana*, *C. stipulosa*, *C. nelsoni*), Crusgalli (*C. gracilior*, *C. rosei* Eggl), Madresens Phipps (*C. tracyi*, *C. aurescens* Phipps), Parvifoliae (*C. uniflora*), Greggianeae (*C. greggiana*, *C. serratisima* Phipps, *C. sulfúrea* Phipps, *C. grandifolia* Phipps) y Baroussaneae

Phipps (*C. baroussana*, *C. cuprina* Phipps, *C. johnstonii* Phipps). Las especies *C. mexicana* y *C. gracilior* Phipps, además de ser endémicas, son las más abundantes en la zona central de México (Núñez-Colín y Hernández-Martínez, 2011).

2.2.2. Propiedades farmacológicas y metabolitos secundarios característicos

Crataegus posee varios efectos farmacológicos reportados. Por ejemplo, en el sistema cardiovascular, aumenta la contractilidad del miocardio y expande la arteria coronaria, disminuye el ritmo cardíaco, el consumo de oxígeno del miocardio y la resistencia periférica. En el sistema digestivo, reduce la contractibilidad del músculo liso gástrico e intestinal y también posee efecto antimicrobiano (Wang y col., 2010). Además, se ha utilizado para tratar otros padecimientos como la diarrea, el insomnio, las enfermedades de la vesícula biliar y problemas respiratorios (tos, gripe, bronquitis, asma) (Pawlaczyk-Graja, 2018). Las hojas, flores y frutos de *Crataegus* contienen una variedad de compuestos, similares a bioflavonoides, que parecen ser los principales responsables de las acciones sobre el sistema cardiovascular (Kumar y col., 2012).

Hasta la fecha, más de 150 compuestos químicos se han identificado de estas plantas, incluidos flavonoides, triterpenos, lignanos, ácidos orgánicos y compuestos que contienen nitrógeno. Los flavonoides en sus diferentes estructuras (flavonas, flavonoles, flavononas, flavanoles, así como polímeros de flavanoles o procianidinas) son los compuestos químicos más abundantes en *Crataegus* (Wu y col., 2014) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Principales flavonoides aislados de *Crataegus* (Wu y col., 2014).

Componente químico	Parte de la planta
Apigenina	Hojas
Luteolina	
Orientina	
Isoorientina	
Isovitexina	
Hiperósido	
Crataequinona B	
Kaempferol	
Quercetina	
Herbacetina	
Santina	
5-Hidroxiauranetina	
Rutina	
(+) -Taxifolina	
Eriodictyol-5,3'-di-glucósido	
(+) -Taxifolina 3-O-arabinopiranosil 3-O-arabinopyranósido	
(+) -Taxifolina 3-O-xilopiranosido	
Cratesida	
(+) -Catequina	
(-) -Epicatequina	
Epicatequin-(4 β →6)-Epicatequin-(4 β →8)-epicatequina	

Tabla 1. Principales flavonoides aislados de *Crataegus* (Wu y col., 2014) (continuación).

Componente químico	Parte de la planta	
Vitexina	Flores	
Ramnosil Vitexina		
Pinnatifinósidos A-D e I		
3, 4-di-O-Acetil-2-O- α -ramosilvitexina		
Schaftósido		
Isoschaftósido		
Neoschaftósida		
Acetilvitexina		
Neoisoschaftósida		
Cratenacina		
8-Metoxikaempferol		
Pinnatifidina		
8-Metoxi-3-neohesperidosil kaempferol		Hojas, Frutos
Naringenina-5,7-di-glucósido		
Leucocianidina	Frutos	
Epicatequin-(4 β →8)-Epicatequin-(4 β →6)-epicatequina		
Proantocianidina A2	Hojas, Flores	

Los flavonoides son compuestos fenólicos de 15 carbonos que se distribuyen en el reino vegetal. En su estructura química, contienen un número variable de grupos fenólicos. Funcionan como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, además de otorgarle protección frente a la acción de los patógenos y de los animales herbívoros; también pueden atraer a los animales polinizadores (Solís, 2015).

Químicamente, los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos ($C_6-C_3-C_6$), integrado por dos anillos de fenilos ligados a través de un anillo de pirano (Russo y Speranza, 2006) (**Figura 4**).

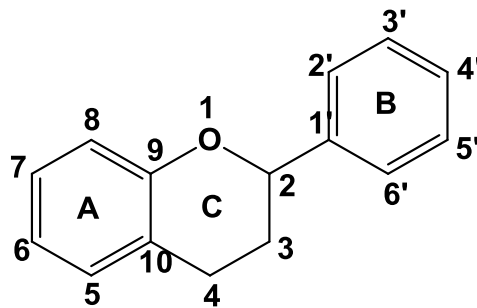


Figura 4. Esqueleto básico de los flavonoides (Russo y Speranza, 2006).

Según Solís (2015) y Russo y Speranza (2006), los flavonoides (**Figura 5**) se pueden clasificar en función de sus características estructurales en:

1. Flavanos, como las catequinas, con un grupo $-OH$ en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercetina, que posee un doble enlace entre los carbonos C2-C3, un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo $-OH$ en posición 3 del anillo C. Suelen ser incoloros o amarillos y se encuentran en las hojas de las plantas. Los flavonoles ayudan a la buena circulación sanguínea, mantienen los vasos sanguíneos flexibles, y también ayudan a mantener una función sana cerebral al elevar el flujo sanguíneo en áreas claves del cerebro.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un doble enlace entre los carbonos C2-C3, un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3. Son metabolitos de color amarillo presentes en algunas flores o frutos.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo $-OH$ en posición 3 del catión flavilo (anillo C) y con un patrón de sustitución muy variado con otros grupos OH.

Son pigmentos que confieren las coloraciones rojas, azules y violetas de numerosas flores, frutos, hojas y semillas.

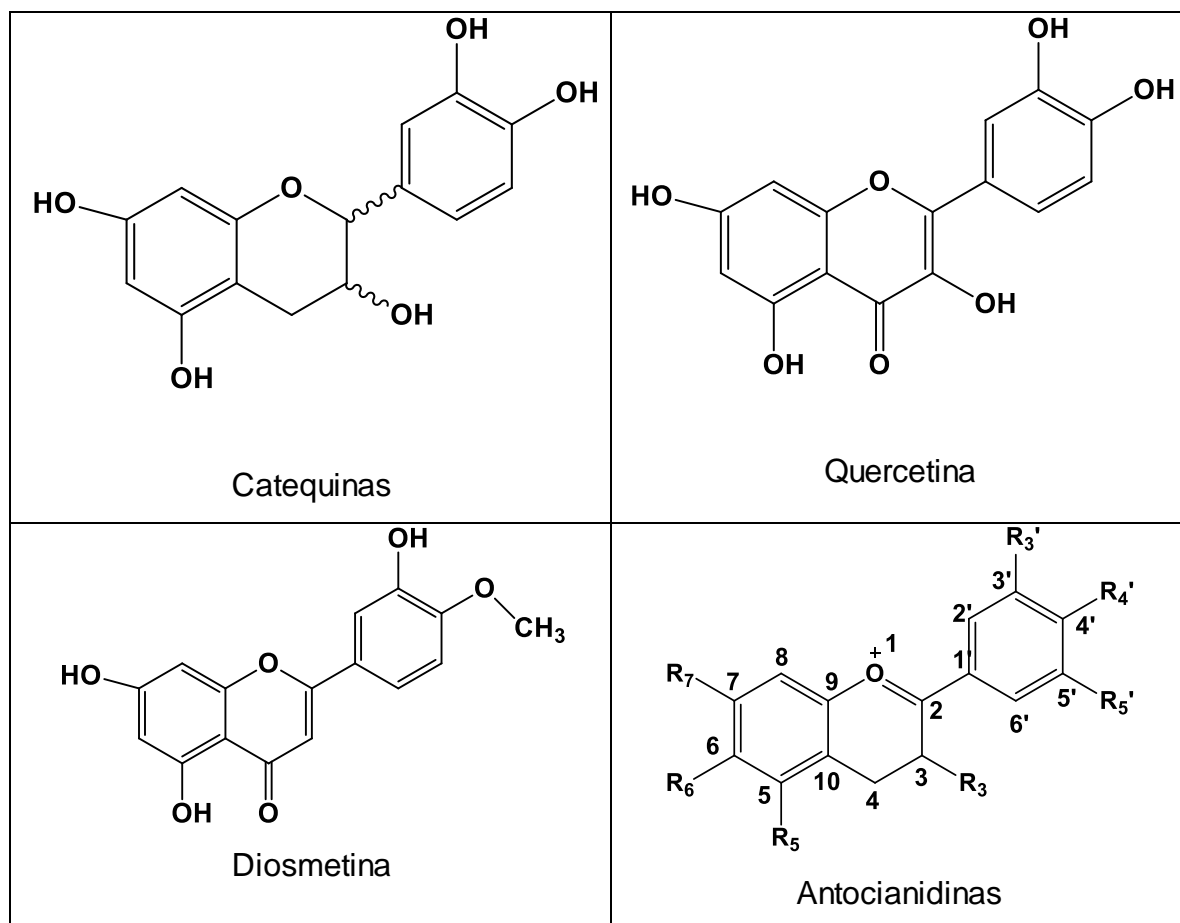


Figura 5. Características estructurales de los principales tipos de flavonoides (Russo y Speranza, 2006).

Las isoflavonas y las flavonas parecen ser igualmente activas, mientras que la presencia de un grupo carbonilo en la posición 4 y un doble enlace C2-C3 parecen ser requisitos indispensables para el efecto vasodilatador. Los flavonoides ejercen mayoritariamente un efecto vasodilatador en el músculo liso de aorta aislada, de manera dependiente de la estructura del compuesto. En oposición a lo dicho anteriormente, determinadas moléculas de estructura flavonoide tienen una acción

bifásica sobre los vasos sanguíneos: vasoconstrictora a las concentraciones activas más bajas y vasodilatadora a concentraciones mayores. Es el caso de aquellos compuestos que contienen tres grupos hidroxilos en posiciones contiguas de los anillos A o B, como la baicaleína y la miricetina (Álvarez y Orallo, 2003).

Según su capacidad para inducir vasorrelajación, es posible clasificar los flavonoides, teniendo en cuenta su potencia y su eficacia. El orden es el siguiente: flavonas (apigenina y luteolina) > flavonoles (kaempferol y quercetina) > isoflavonas (genisteína y daidzeína) > flavonoles (naringenina) > chalconas (floreína) > antocianidinas (pelargonidina) > flavanoles [(+)-catequina y (-)-epicatequina]. El efecto vasorrelajante disminuye cuando el compuesto presenta más grupos OH en el anillo B, ya que esto afecta al farmacóforo en los flavonoides, es decir, al grupo 4'-OH. Parece que la presencia del grupo 3-OH en el anillo C o la glicosilación de este grupo OH también disminuye el efecto de relajación. Cabe señalar que los compuestos con mejores efectos vasorrelajantes poseen un 5-OH, 7-OH, 4'-OH, C(2)=C(3) y funcionalidades C(4)=O (Xu y col., 2007).

El kaempferol, la quercetina, la vitexina y la rutina (Figura 6) son los flavonoides más abundantes en las hojas de *Crataegus* (Yang y Liu, 2012).

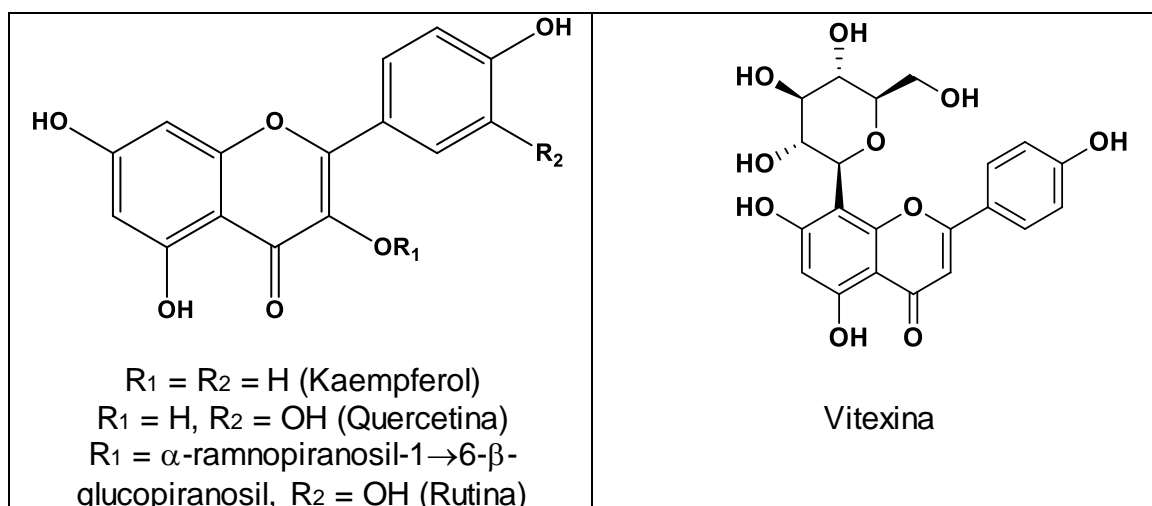


Figura 6. Flavonoides más abundantes en las hojas de *Crataegus* (Yang y Liu, 2012).

La mayoría de las especies de *Crataegus* estudiadas se encuentran en los continentes asiático (China y Corea) y europeo. Algunos estudios químicos de especies mexicanas condujeron al aislamiento de los ácidos ursólico y corosólico, así como a la identificación de la rutina, el kaempferol, la quercetina y la (+)-catequina en el extracto metanólico de las hojas de *Crataegus gracilior* (Hernández-Pérez y col., 2014). De las flores de *Crataegus gracilior*, se aislaron los ácidos corosólico y euscápico, así como el daucosterol (Torres-Ortiz y col., 2019) y, de las fracciones poco polares del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei*, se aislaron e identificaron los ácidos ursólico, 3-epicorosólico, maslínico y euscápico (**Figura 7**) (López-Fitz, 2019).

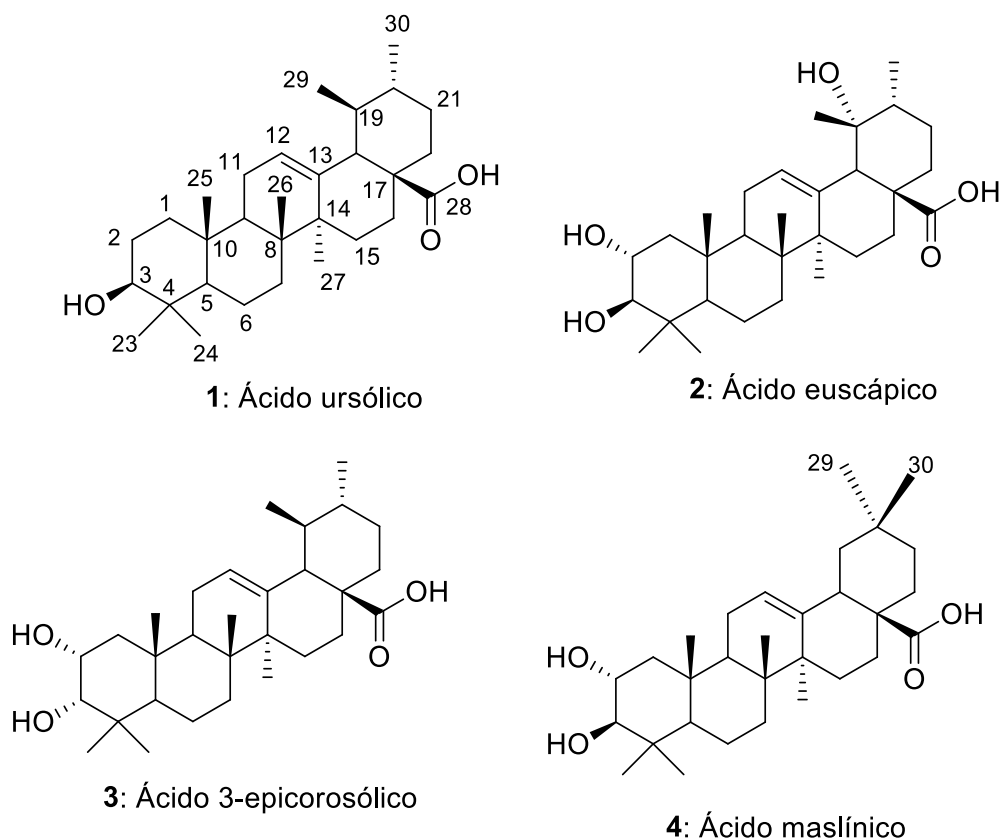


Figura 7. Estructuras de los ácidos triterpénicos caracterizados en las hojas de *C. rosei* (López-Fitz, 2019).

2.3. Extractos vegetales estandarizados

2.3.1. Generalidades

La fitofarmacología es la rama de la farmacología que se dedica al estudio de los extractos estandarizados de plantas medicinales. Los extractos estandarizados son de alta calidad y contienen niveles consistentes de compuestos específicos. También se conocen como fitomedicamentos y en México, como medicamentos herbolarios. La mayoría de los fitomedicamentos contienen numerosos compuestos. La calidad de producción, los procedimientos de manufactura y especialmente la estandarización del extracto son particularmente importantes en el desarrollo y producción de los fitomedicamentos (Romero-Cerecero y Tortoriello-García, 2006).

2.3.2. Extractos estandarizados del género *Crataegus*

Los extractos obtenidos de frutos, hojas y flores de *Crataegus* pueden prevenir la hipertensión, ayudan a mejorar la circulación sanguínea, la disfunción miocárdica, la aterosclerosis, la dislipidemia y la insuficiencia cardíaca (Dong y col., 2017). Estos extractos presentan además efectos inotrópicos positivos, antiagregantes plaquetarios, vasodilatadores y protectores del endotelio. También reducen la migración y proliferación de células musculares lisas y ejercen efectos protectores contra isquemia/lesión por reperfusión y efecto antiarrítmico (Wang y col., 2013).

Los extractos estandarizados más usados y estudiados de *Crataegus* son WS[®] 1442 y LI[®] 132, los cuales son obtenidos a partir de las hojas y las flores. El extracto WS[®] 1442 (**Figura 8**) es utilizado para tratar la insuficiencia cardíaca congestiva de clase II (Bubik y col., 2012). Algunos de los efectos benéficos de este extracto para tratar enfermedades cardiovasculares se deben a que contiene flavonoides monoméricos y procianidinas oligoméricas (Fürst y col., 2010), aunque Zorniak y colaboradores (2017) también demostraron que este extracto estandarizado presenta algunos efectos secundarios, como vértigo, mareos, náuseas, fatiga, sudoración, palpitaciones, dolor de cabeza y epistaxis.

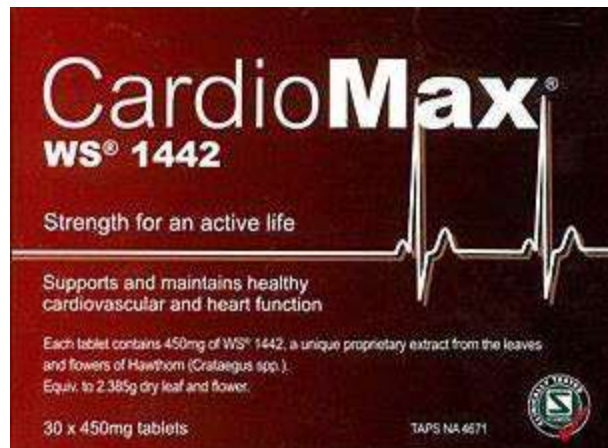


Figura 8. Extracto estandarizado WS® 1442 (Fürst y col., 2010).

Por su parte, el extracto LI® 132 es utilizado como tratamiento complementario de la insuficiencia cardíaca crónica, ayudando a controlar los síntomas. Sin embargo, dentro de los estudios realizados, también se encontraron algunos efectos secundarios como mareos, vértigo, molestias gastrointestinales, dolor de cabeza, migraña y palpitaciones (Wang y col., 2013).

2.4. Enfermedades cardiovasculares (ECV)

Las ECV afectan principalmente al corazón y a los vasos sanguíneos. El aumento de las ECV tiene una relación directa con factores de riesgo de tipo cardiovascular, cuya presencia confiere una mayor probabilidad de sufrir estas enfermedades. Los principales factores de riesgo cardiovascular son: alteraciones en el peso, inactividad física, ingesta de alcohol y consumo de tabaco para la población mexicana. Aunque hay poca información que relacione las condiciones de trabajo, el estrés laboral y las horas de descanso con las ECV, se empieza a reconocer el impacto que éstos ejercen en la aparición de estas enfermedades (Castro-Juárez y col., 2018).

En México, datos estadísticos del INEGI (2021) colocan a las enfermedades del corazón, las cuales ascendieron a un total de 113,899, en el segundo lugar entre las diez principales causas de muertes, destacando en particular las isquémicas del

corazón (**Tabla 2**). En el primer lugar, estuvieron las muertes causadas por el COVID-19 con 145,159 en 2020 (**Tabla 2**).

Tabla 2. Principales causas de muerte en México (INEGI, 2021).

Posición	Hombres	Mujeres	Total
1	COVID-19 89,716	COVID-19 55,437	COVID-19 145,159
2	Enfermedades del corazón 62,617	Enfermedades del corazón 51,276	Enfermedades del corazón 113,899
3	Diabetes mellitus 38,355	Diabetes mellitus 36,056	Diabetes mellitus 74,418
4	Tumores malignos 21,482	Tumores malignos 22,714	Tumores malignos 44,197
5	Enfermedades del hígado 15,041	Enfermedades cerebrovasculares 9,161	Influenza y neumonía 20,956

2.4.1. Principales enfermedades cardiovasculares

2.4.1.1. Hipertensión arterial (HTA)

La presión arterial es la medición de la fuerza ejercida contra las paredes de las arterias a medida que el corazón bombea sangre al cuerpo. Según la Secretaría de Salud, el valor óptimo debe ser 120/80 mmHg y el valor normal tiene un rango de 120/80 mmHg a 129/84 mmHg, según el estilo de vida de la persona. Hipertensión es el término que se utiliza para describir la presión arterial alta. Se dice que una persona tiene HTA, cuando la presión sistólica es igual o mayor a 140 mmHg y la presión diastólica es igual o mayor a 90 mmHg. La HTA es uno de los factores de riesgo más importantes para la enfermedad vascular cerebral y ha aumentado a causa del alto consumo de sodio y grasas saturadas, el tabaquismo, la obesidad, la

inactividad física y las dietas bajas en frutas y verduras (González-Guzmán y Alcalá-Ramírez, 2010).

La OMS y la sociedad internacional de hipertensión clasifican a los fármacos antihipertensivos en seis grupos, de acuerdo con su mecanismo de acción (Cruz-Aranda, 2019) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Fármacos antihipertensivos de acuerdo con su mecanismo de acción.

Mecanismo de acción	Ejemplo de fármacos	Referencia
α-bloqueantes	Fentolamina, Prazosina Fenoxibenzamina	Flórez, 2014
β-bloqueantes	Propranolol, Nadolol, Metoprolol	Laurent, 2017
Antagonistas de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje	Amlodipino, Felodipino, Nicardipino	Flórez, 2014
Diuréticos	Hidroclorotiazida, Clortalidona	Saturno-Chiu, 2017
Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs)	Captopril, Enalapril, Ramipril	Kaur y col., 2015
Antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA II)	Losartán, Valsartán, Irbesartán	Laurent, 2017

2.4.1.2. Cardiopatía isquémica

La cardiopatía isquémica se produce cuando se obstruye una arteria del corazón. Si es de manera lenta, se habla de angina de pecho; si se tapona de forma rápida, es cuando se produce un infarto. Es la primera causa de muerte en adultos en el mundo. La modificación de los estilos de vida es el factor fundamental para evitar o prevenir esta enfermedad. La prevalencia de cardiopatía isquémica aumenta con la

edad y es superior en los hombres que en las mujeres. Se calcula que la incidencia de enfermedad coronaria en edades de entre 65 y 94 años se duplica en los varones y se triplica en las mujeres respecto a edades entre 35 y 64 años. En los hombres, se presenta con mayor frecuencia en forma de infarto, mientras que en las mujeres es más frecuente que desarrollen la angina de pecho o angina pectoris (Clínic Barcelona, 2022).

2.4.1.3. Angina de pecho

Cuando la arteria coronaria se encuentra obstruida de forma significativa, habitualmente con una reducción de más del 75% de su luz, pueden empezar a aparecer síntomas secundarios a la falta de oxígeno en las células del músculo cardiaco. Esa falta de irrigación sanguínea se traduce en forma de dolor en el pecho que aparece normalmente cuando se realiza un esfuerzo (Clínic Barcelona, 2022). Según Gimenez-Serrano (2004), en función de la forma en que se manifieste, se pueden distinguir varios tipos de angina de pecho:

- Angina estable, que ocurre cuando el corazón trabaja más fuerte de lo usual y se trata con descanso.
- Angina inestable, la cual no sigue un patrón y puede ocurrir sin hacer algún esfuerzo físico. Es la más peligrosa, ya que no desaparece, ni con reposo, ni con medicinas.
- Angina variable, que ocurre cuando el paciente está descansando; es tratable con medicamentos.

2.4.1.4. Infarto agudo al miocardio (IAM)

El IAM es la primera causa de muerte en México. A diario, decenas de mexicanos en edad productiva fallecen a causa del IAM, para el cual no existe un programa nacional dirigido a su tratamiento (IAM-Salud, 2017). Si la falta de oxígeno es más grave o prolongada, algunas células del corazón pueden llegar a morir; es lo que se conoce con el término necrosis o infarto de miocardio. Aunque los síntomas pueden

ser muy parecidos a los de la angina de pecho, en el caso de infarto, el dolor puede ser más intenso y duradero (Clínica Barcelona, 2022).

Según Defilippo (2018), existen diferentes tipos de infarto de miocardio (**Figura 9**):

- Infarto anterior: la obstrucción se localiza en la arteria coronaria izquierda e influye negativamente en la circulación sanguínea hacia el ventrículo izquierdo. Se considera el tipo más grave de infarto cardíaco y la zona afectada se encuentra en la parte anterior del músculo cardíaco.
- Infarto posterior o inferior: es menos grave con respecto al infarto anterior. La obstrucción está situada en una de las dos ramas de la arteria coronaria derecha. Afecta sobre todo al tejido muscular cardíaco en el lado posterior del ventrículo derecho.
- Infarto lateral: es causado por la oclusión de la arteria circunfleja y provoca un infarto en la parte posterior y lateral del ventrículo izquierdo.

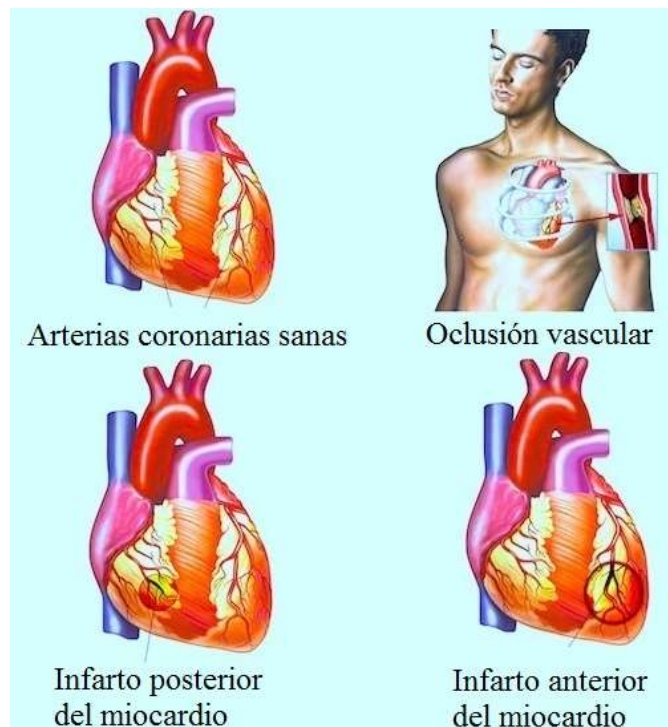


Figura 9. Tipos de infartos agudos al miocardio (Defilippo, 2018).

2.5. Estudios químicos de metabolitos secundarios

2.5.1. Métodos de separación e identificación de metabolitos secundarios

Aunque hay numerosos métodos de separación de metabolitos secundarios que se emplean, de acuerdo a la naturaleza de los compuestos, los más versátiles hacen uso de las diferentes cromatografías. La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales está en reposo (fase estacionaria), mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida (Coskun, 2016).

Según González-Benito (2016), la técnica cromatográfica de purificación consiste en separar mezclas de compuestos en función de su diferente afinidad entre ambas fases (estacionaria y móvil). Dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria y de la fase móvil, se pueden diferenciar los siguientes tipos de cromatografía:

- Cromatografía sólido-líquido, en la que la fase estacionaria es sólida y la móvil es líquida.
- Cromatografía líquido-líquido, en la que ambas fases son líquidas.
- Cromatografía líquido-gas, en que la fase estacionaria es líquida y la móvil es gaseosa.
- Cromatografía sólido-gas, en que la fase estacionaria es un sólido y la móvil es gaseosa. Ésta se conoce comúnmente como cromatografía de gases (CG).

De las cromatografías para la separación de compuestos no fácilmente volatilizables, las más usadas son la de capa fina y la de columna. De esta última, destaca la de líquidos de alta resolución.

2.5.1.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía plana (CP) consiste en la separación de mezclas de compuestos orgánicos, utilizando capas finas de adsorbentes. La CP más usada es la muy popular de capa fina (CCF), que es la más fácil de realizar y la más barata para la separación de productos naturales. Sin embargo, los extractos de productos naturales son químicamente muy complejos que pueden contener compuestos neutros, ácidos, básicos, lipofílicos, hidrofílicos y anfifílicos (como los aminoácidos).

Esa complejidad constituye un reto a veces muy difícil de superar, por lo tanto, el método tiene alcances muy limitados para lograr la separación de mezclas tan complejas. Por otra parte, la identificación de compuestos mediante este método requiere de estándares y se limita a la disponibilidad de los mismos. Por eso, se recurre a técnicas de mayor potencia de resolución, sobre todo para compuestos desconocidos (Gibbons, 2006).

2.5.1.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Para el análisis de muestras vegetales, se requieren técnicas cromatográficas muy selectivas y sensibles, ya que la composición de dichas muestras es muy compleja. Es por esto que se emplea la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución. En esta técnica, se utilizan detectores como los de ultravioleta-visible (UV-Vis), programables a una o más longitudes de onda. Estos detectores permiten diferenciar los compuestos químicos que se estén analizando. La cromatografía de líquidos permite una mejor resolución entre compuestos a diferencia de otras técnicas. El tamaño de partícula de la fase estacionaria va desde 10 μm hasta 3 μm , lo cual permite una mejor separación de compuestos, aunque está acompañada del desarrollo de altas presiones dentro de la columna (Sarker y Nahar, 2012). Finalmente, es importante destacar que varias de esas técnicas suelen acoplarse para la separación y la identificación simultáneas de los compuestos presentes en una matriz de origen natural (planta, bacteria, hongo, o animal), siendo las más versátiles, la HPLC-EM y la HPLC-RMN.

2.5.2. Métodos de identificación

2.5.2.1. Espectrometría de masas (EM)

La técnica se basa en la impartición de carga a las moléculas y en su fragmentación, así como en analizar dichos fragmentos para la reconstitución de las estructuras originales de los compuestos naturales. Las técnicas de ionización más empleadas en EM son: impacto electrónico (IE), ionización química (IQ) y la electronebulización también conocida como "Electrospray". Esta última constituye un método de

ionización suave, lo que permite determinar la masa molecular de un compuesto, dato fundamental para la elucidación estructural de un compuesto (Talha, 2020).

3. JUSTIFICACIÓN

Estudios previos han demostrado que las plantas del género *Crataegus* presentan varias actividades farmacológicas, debido a los metabolitos secundarios que contienen, habiendo sido hasta la fecha los flavonoides los de mayor interés. Estas plantas se han utilizado en la medicina tradicional de muchos países, incluyendo México, para tratar diversas enfermedades cardiovasculares (ECV), entre ellas la hipertensión arterial, la cardiopatía isquémica, la arteriosclerosis, la angina de pecho, la insuficiencia cardíaca, el infarto al miocardio, enfermedades cerebrovasculares, etc., lo que es de suma importancia ya que las ECV son la principal causa de muerte en México. El tratamiento de esas enfermedades mediante el uso de medicamentos alópatas es muy costoso, además de acarrear muchos efectos indeseables. Por esta razón, varios países, sobre todo desarrollados, como Alemania, China, Estados Unidos y Canadá han desarrollado extractos estandarizados a partir de especies de *Crataegus* que crecen en sus territorios. Dichos extractos se encuentran actualmente en el mercado para su uso clínico. En cambio, pocas de las 15 especies mexicanas han sido objeto de evaluación química y farmacológica. En el presente trabajo, se estudiaron las tres fracciones más polares obtenidas del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei* para identificar sus compuestos y para determinar su actividad vasodilatadora. Los resultados obtenidos de esos estudios contribuyeron a validar el uso tradicional de la planta para tratar la hipertensión y, al mismo tiempo, proyectar la obtención de un extracto estandarizado eficaz y más accesible para las personas que padecen ECV.

4. HIPÓTESIS

Las fracciones más polares del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei* presentan mayor actividad vasodilatadora que la del extracto que le dio origen, debido a su alto contenido de compuestos fenólicos.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Caracterizar químicamente y determinar la actividad vasodilatadora de las fracciones más polares del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei* y la de sus constituyentes mayoritarios.

5.2. Específicos

- Determinar la actividad vasodilatadora de las fracciones más polares del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei* en aorta aislada de rata macho de la cepa Wistar.
- Obtener los constituyentes mayoritarios de las fracciones más polares con mayor actividad vasodilatadora.
- Identificar la estructura química de los constituyentes mayoritarios.
- Determinar la actividad vasodilatadora en aorta aislada de rata de los compuestos identificados en caso de no estar reportada.

6. METODOLOGÍA

6.1. Obtención de las fracciones objeto de estudio

Las fracciones más polares (406, 407 y 408) que fueron objeto del presente estudio derivaron del fraccionamiento primario del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei*, cuya metodología se describe en la tesis de maestría de Diana López Fitz (2019) de donde se obtuvieron 419 fracciones. En resumen, dichas fracciones eluyeron de la columna de fraccionamiento con metanol al 100%. Fueron seleccionadas por su alta polaridad y porque contaban con mayor rendimiento en comparación con las otras. Primeramente, fueron analizadas por separado para determinar su complejidad química mediante CCF y después, mediante HPLC-DAD.

6.2. Evaluación farmacológica

6.2.1. Modelo experimental

La evaluación farmacológica se realizó en ratas macho de la cepa Wistar con un peso aproximado de 275-325 g. Los animales se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla, Querétaro, México. Durante su estadía, los animales se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas 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.

6.2.2. Preparación de las fracciones

Las fracciones 406-408 fueron seleccionadas por su alta polaridad y porque contaban con mayor rendimiento en comparación con las otras que eluyeron con metanol. Primeramente, se realizó el ensayo farmacológico con 30 mg de la mezcla de las fracciones 406 y 407. A esta se le agregaron 60 μ L de DMSO y se agitó en un Vortex durante 20 min para obtener una solución homogénea. Después, se le adicionaron 1,740 μ L de agua destilada, agitando nuevamente en el Vortex y a partir

de esta solución, se realizaron dos diluciones (1:10 y 1:100). Después, se realizó el ensayo farmacológico con la mezcla de las tres fracciones siguiendo la misma metodología.

6.2.3. Ensayo farmacológico ex vivo en aorta de rata

Para la evaluación de la actividad vasorrelajante de las fracciones, se llevó a cabo el ensayo de aorta aislada de rata de acuerdo con la metodología desarrollada por Ibarra-Alvarado y col. (2010). Los animales fueron sacrificados por decapitación conforme al apartado 9.5.3.3 de la NOM-062-ZOO-1999 con previa anestesia por inhalación de isoflurano. Posteriormente, se extrajo la aorta torácica, la cual se colocó en cajas de Petri que contenían solución de Krebs-Henseleit (NaCl 126.8 mM, KCl 5.9 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 30 mM y D-glucosa 5.0 mM con un pH 7.4) oxigenada de manera continua con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). La aorta se lavó con solución Krebs-Henseleit para evitar la formación de coágulos intravasculares y se eliminó el tejido conectivo. La aorta se cortó en anillos de 4 a 5 mm de longitud, los cuales se sujetaron entre ganchos de acero inoxidable y se colocaron en cámaras de incubación de 5 mL con solución de Krebs-Henseleit a 37 °C, con un burbujeo constante de carbógeno. El tejido se equilibró durante 60 minutos bajo una tensión de 1.5 g. Para verificar la integridad de los anillos, se precontrajeron con una solución de 100 mM de KCl durante 15 min hasta que alcanzaron un valor estable de contracción (fase de meseta). Posteriormente, el medio del baño se cambió 3 veces cada 15 minutos. Después, el tejido se contrajo con 50 µL de fenilefrina (1 µM) y se registró la fuerza de contracción desarrollada. Una vez alcanzada la contracción máxima, se adicionaron las fracciones en concentraciones crecientes acumulativas (1 µg/mL, 3.16 µg/mL, 10 µg/mL, 31.6 µg/mL, 100 µg/mL, 316 µg/mL, 1000 µg/mL) a intervalos de tiempo (10 minutos) para obtener una relajación estable con cada concentración. La acetilcolina (ACh) fue utilizada como control positivo, empleando las mismas concentraciones que fueron preparadas para la mezcla de las fracciones.

La tensión isométrica se midió con un transductor de desplazamiento de fuerza Grass modelo FT03 unido a un polígrafo de marca Grass 7D. Las respuestas se expresaron como el porcentaje de la contracción inicial alcanzada al adicionar la fenilefrina.

6.3. Análisis estadístico en los ensayos farmacológicos

En las evaluaciones farmacológicas, se realizaron 4 réplicas para cada una de las concentraciones. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm el error estándar del promedio (SEM). Se construyeron curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador de las fracciones, mediante el programa PRISMA 6.0 Graph Pad (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) y, en cada caso, se determinó la concentración efectiva media (CE_{50}) y el efecto máximo (E_{max}).

6.4. Estudio químico

6.4.1. Métodos de separación y purificación

6.4.1.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

Para el análisis preliminar de los perfiles químicos de las fracciones, se utilizaron cromatofolios recubiertos de gel de sílice (Sílica gel 60 F₂₅₄ Merck) de 3 cm x 7 cm. Las eluciones se llevaron a cabo, utilizando diclorometano (CH₂Cl₂) y metanol (MeOH) en diferentes proporciones. La detección de los compuestos se realizó utilizando una lámpara UV-Vis a las longitudes de onda de 254 y 365 nm y el cromógeno sulfato cérico amoniacal dihidratado [(NH₄)₄Ce(SO₄)₄.2H₂O)] con calentamiento a 80 °C. Los resultados obtenidos de este análisis preliminar sirvieron de guía para definir el tipo de columna y la composición de las fases móviles en la cromatografía de líquidos de alta resolución para la purificación de sus constituyentes individuales.

6.4.1.2. Cromatografía de líquidos

Para ampliar la identificación del mayor número de constituyentes químicos de las fracciones objeto de estudio, se emplearon dos sistemas cromatográficos de líquidos (HPLC) diferentes, acoplados cada uno a un diferente detector.

6.4.1.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de arreglo de Diodos (HPLC-DAD)

Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo marca Waters (Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA), integrado por una bomba cuaternaria de entrega automática de disolventes (fases móviles), modelo e2695 acoplado a un detector de arreglo de Diodos (DAD), modelo 2998. Debido a la polaridad de las fracciones, como fase estacionaria, se utilizó una columna analítica de fase reversa ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 5 Micron) (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA). La adquisición y el procesamiento de datos se llevó a cabo utilizando el programa Empower3 (Waters).

Se utilizaron dos métodos para la caracterización de flavonoides. Las condiciones para el primero fueron las siguientes:

- Fase A: 99% de agua y 1% de ácido fosfórico.
- Fase B de 99% de metanol y 1% de ácido fosfórico.

El flujo fue de 0.8 mL/min, el volumen de inyección de 40 µL, la λ de detección de 380 nm y el tiempo de corrida de 65 min. En la **Tabla 4**, se muestra la composición del gradiente empleado para este análisis.

Tabla 4. Método 1 utilizado para la identificación de flavonoides en la mezcla de las fracciones 406-408.

Tiempo (min)	Composición de la fase móvil	
	Fase A	Fase B
0	100%	0%
45	0%	100%
55	100%	0%
65	100%	0%

El segundo método (Método 2) fue similar al primero.

- Fase A: 99% de agua y 1% de ácido acético 0.0125N.
- Fase B: acetonitrilo.

El flujo fue de 0.8 mL/min, el volumen de inyección de 40 μ L, la λ de detección de 280 nm y el tiempo de corrida de 30 min. En la **Tabla 5**, se muestra la composición del gradiente empleado para este análisis.

Tabla 5. Método 2 utilizado para la identificación de flavonoides en la mezcla de las fracciones 406-408.

Tiempo (min)	Composición de la fase móvil	
	Fase A	Fase B
0	95%	5%
2	95%	5%
5	85%	15%
20	50%	50%
25	95%	5%
30	95%	5%

6.4.1.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC-EM)

El análisis mediante espectrometría de masas se llevó a cabo en un equipo Acquity UPLC I-class con un detector de arreglo de diodos acoplado a un espectrómetro de masas con fuente de ionización ESI y tiempo de vuelo VION IMS marca Waters. Las condiciones del análisis fueron las siguientes:

La muestra fue diluida en metanol grado espectrometría de masas a una concentración de 1 mg/mL. La columna empleada fue BEH C18, 2.1 x 100 mm, 1.7 µm de tamaño de partícula.

Las fases móviles empleadas fueron:

- Fase A: 95% de agua acidulada con ácido fórmico a una concentración de 0.0125 N y 5% de acetonitrilo.
- Fase B: una mezcla de 50% de agua acidulada.

La composición del gradiente empleado se muestra en la **tabla 6**.

Tabla 6. Condiciones para el análisis de la mezcla de las fracciones 406 y 407 mediante HPLC-EM.

Tiempo (min)	Composición de la fase móvil	
	Fase A	Fase B
0	100%	0%
0.73	100%	0%
2.73	77.5%	22.5%
12.73	0%	100%
16.07	100%	0%
22.73	100%	0%

El flujo fue de 0.21 mL/min, la temperatura de la columna de 35 °C, la temperatura de la muestra de 10 °C y el volumen de inyección de 2.8 µL. Se llevó a cabo un barrido de absorbancia de 210 a 600 nm con canales específicos de 214, 280, 320

y 360. La ionización se efectuó en modo negativo. El modo de análisis fue MS^E, en el que la energía de colisión baja fue de 6 eV con una rampa de 15 a 45 eV en alta energía. El rango de masas se consideró de 50 a 1000 m/z. El voltaje del capilar empleado fue de 2 kV, la temperatura de la fuente de 150 °C y la temperatura de desolvatación de 400 °C. Se usó argón como gas de colisión y desolvatación con un flujo de 50 L/h, respectivamente y un voltaje de cono de 40 V. Se utilizó leucina encefálica en una concentración de 200 pg/μL como referencia para la corrección de masas con un flujo de 10 μL/min.

Para el análisis de datos, se empleó el Software Unifi 1.9 SR 4 con bibliotecas propias del Laboratorio Especializado en Análisis de Alimentos. Se estableció la tolerancia de coincidencia de objetivos de 5 ppm. Para la identificación de fragmentos, se comparó con patrones de fragmentación reportados en PubChem, FooDB versión 1.0, HMDB versión 5.0 y MassBank of North America (MoNA).

6.4.1.5. Cromatografía en columna abierta (CC)

Para el aislamiento y purificación de los compuestos de las fracciones, se siguió la metodología fitoquímica tradicional usada de manera rutinaria. Se mezclaron las tres fracciones más polares del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei*, dando un peso 1.8965 g. Esta muestra fue adsorbida en 5.9 g de gel de sílice (Kieselgel 60 Merck, tamaño de poro 60 Å, malla de 70-230, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm). Posteriormente, la muestra adsorbida seca se aplicó en una columna de vidrio de 5 cm de diámetro y 65 cm de alto, previamente rellena con 421 g de gel de sílice suspendida en diclorometano. El gradiente de elución estuvo formado por distintas proporciones de diclorometano y metanol, iniciando con 100% del primero y terminando con 100% del segundo.

6.5. Hidrólisis ácida de la mezcla de las fracciones 406-408

Se llevó a cabo una reacción química de hidrólisis ácida a la mezcla de las fracciones 406, 407 y 408, para lo cual se colocaron 400 μL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1.5 N en un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con agua destilada;

por otro lado, en un matraz balón provisto de un agitador magnético, se añadieron 30 mg de la mezcla de las fracciones y 10 mL de la solución de H₂SO₄. La reacción se llevó a cabo a 95 °C en un baño de aceite durante 3 horas.

Transcurrido el tiempo de reacción, se dejó enfriar aproximadamente durante 25 min. En un embudo de separación, se colocó el resultado de la reacción y 10 mL de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) al 10% para neutralizarla. Después, la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 mL) y la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄), se filtró por gravedad y se concentró a sequedad a presión reducida en el evaporador rotatorio. Posteriormente, se analizó dicha fase mediante HPLC, utilizando el método 2 (ver **Tabla 5, página 29**).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Estudios químicos

7.1.1. Hidrólisis ácida de la mezcla de las fracciones 406-408

El producto obtenido de la reacción de hidrólisis ácida se analizó mediante HPLC y se obtuvo el siguiente cromatograma (**Figura 10**), en donde se pueden observar 6 picos mayoritarios. Basándonos en los tiempos de retención (TR) de los picos de la muestra y de los estándares, se pudo deducir que se trataba de los compuestos indicados en la **Tabla 7**.

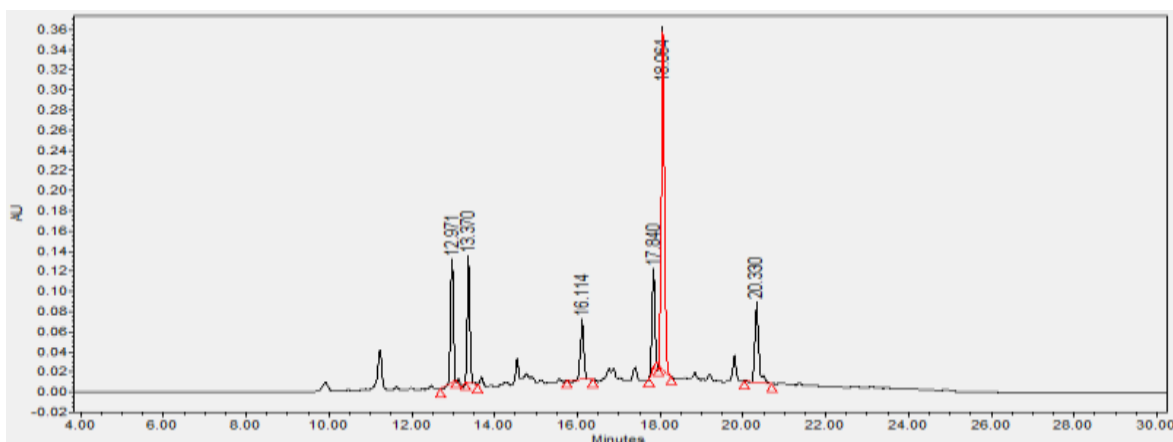


Figura 10. Cromatograma HPLC del producto de hidrólisis ácida de la mezcla de las fracciones 406-408.

Tabla 7. Compuestos identificados mediante la comparación de los TR de los picos de la muestra con los de los estándares.

TR experimental	TR estándar	Compuesto
12.97 min	13.01 min	(+)-Catequina
16.11 min	16.22 min	Ác. cumárico
17.84 min	17.46 min	Ác. rosmarínico
18.06 min	18.68 min	Miricetina
20.33 min	20.90 min	Luteolina

- La (+)-catequina pertenece a la clase de los flavanoles, carece por lo tanto del carbonilo en C(4) y del C(2)=C(3). Su efecto de relajación vascular es muy débil (Xu y col., 2007).
- El ácido cumárico suprime la formación de adipocitos (células almacenadoras de grasas) (Abarca-Vargas y Petricevich, 2018).
- El ácido rosmarínico es un ácido abundante en el romero y tiene efectos antivirales, antiparasitarios, antioxidantes, antiinflamatorios, entre otros, así como acción diurética (Avila-Sosa y col., 2012).
- La miricetina es un compuesto con una triple sustitución hidroxílica en posiciones contiguas del anillo B, por lo tanto, tiene una acción bifásica sobre los vasos sanguíneos: vasoconstrictora a las concentraciones activas más bajas y vasodilatadora a concentraciones mayores (Álvarez y Orallo, 2003).
- La luteolina es un ejemplo de flavonas sin un grupo OH en la posición 3 del anillo C. Parece que la presencia de este grupo (OH en el anillo C) o la glicosilación de este, atenúa el efecto de relajación, por lo que la luteolina es un buen compuesto relajante (Xu y col., 2007). Algunos estudios muestran que la luteolina relaja el músculo liso independientemente del óxido nítrico, otros reportan que este compuesto presenta un efecto vasodilatador tanto dependiente como independiente de este transmisor gaseoso (Si y col., 2014).

7.2. Análisis de las fracciones individuales 406, 407 y 408 mediante HPLC-DAD

Para la implementación de condiciones óptimas de separación de los constituyentes individuales de las fracciones seleccionadas, estas fueron analizadas por separado primeramente mediante CCF, sin lograr identificar un sistema de elución óptimo. Después, se analizaron mediante HPLC-DAD, por separado, utilizando el método 1 (**Tabla 4, página 29**) y se obtuvieron los siguientes cromatogramas (**Figuras 11 y 12**).

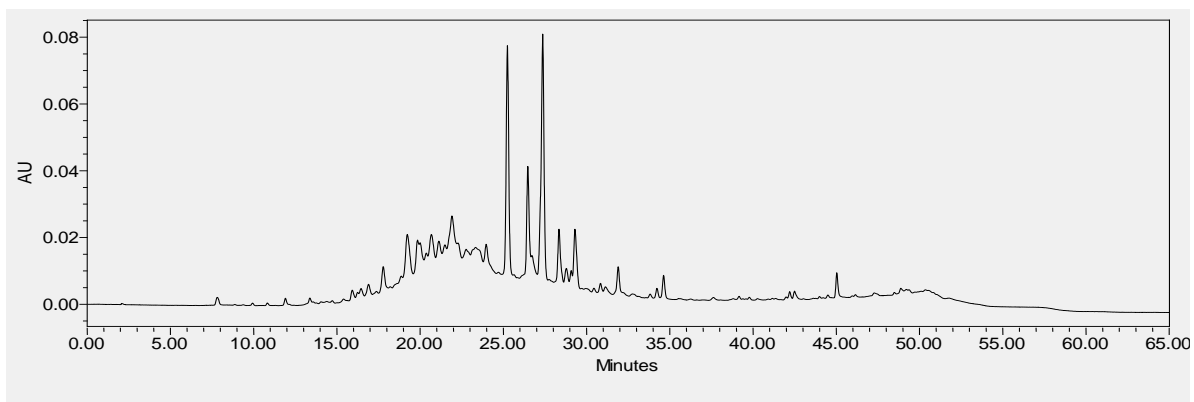


Figura 11. Cromatograma HPLC de la fracción 406 del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei*.

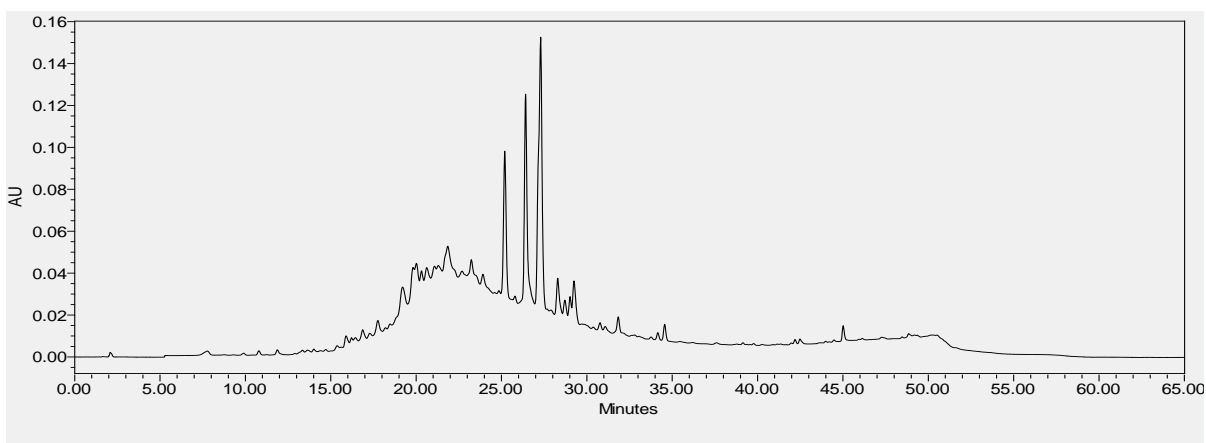


Figura 12. Cromatograma HPLC de la fracción 407 del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei*.

Al comparar ambos cromatogramas, no se observaron diferencias significativas y por lo tanto, se tomó la decisión de mezclar ambas fracciones, cuyo análisis mediante HPLC-DAD generó el siguiente cromatograma (**Figura 13**).

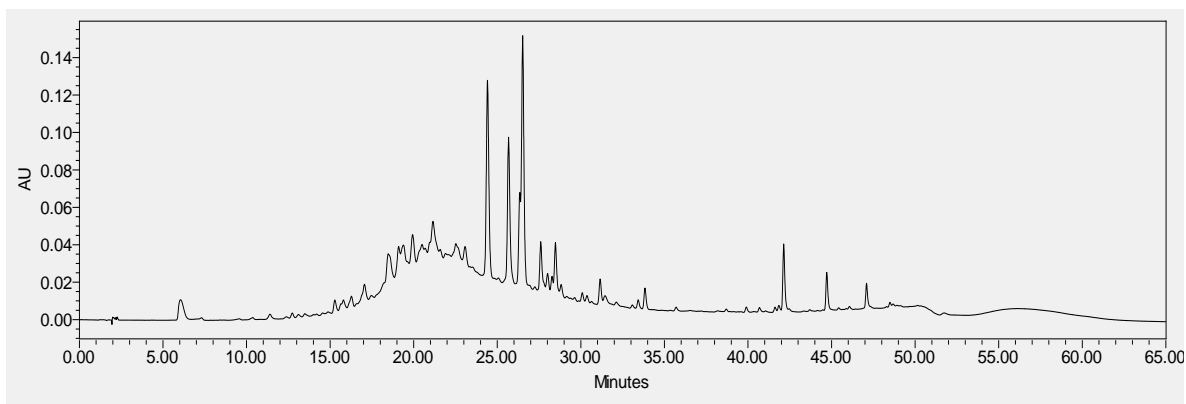


Figura 13. Cromatograma HPLC de la mezcla de las fracciones 406 y 407.

En el cromatograma de la mezcla de fracciones 406 y 407, se observaron 3 picos mayoritarios, de los cuales, 2 pudieron ser identificados al comparar el TR experimental con el TR de los estándares, identificando así, en el pico del minuto 24.84 a la vitexina y en el pico del minuto 26.51 a la rutina. Utilizando el mismo método de comparación de los TR, se identificó en el pico del minuto 19.22 a la epicatequina.

Posteriormente, un análisis de la fracción 408 del extracto metanólico mediante HPLC, utilizando el método 1 (**Tabla 4, página 29**), generó el siguiente cromatograma (**Figura 14**).

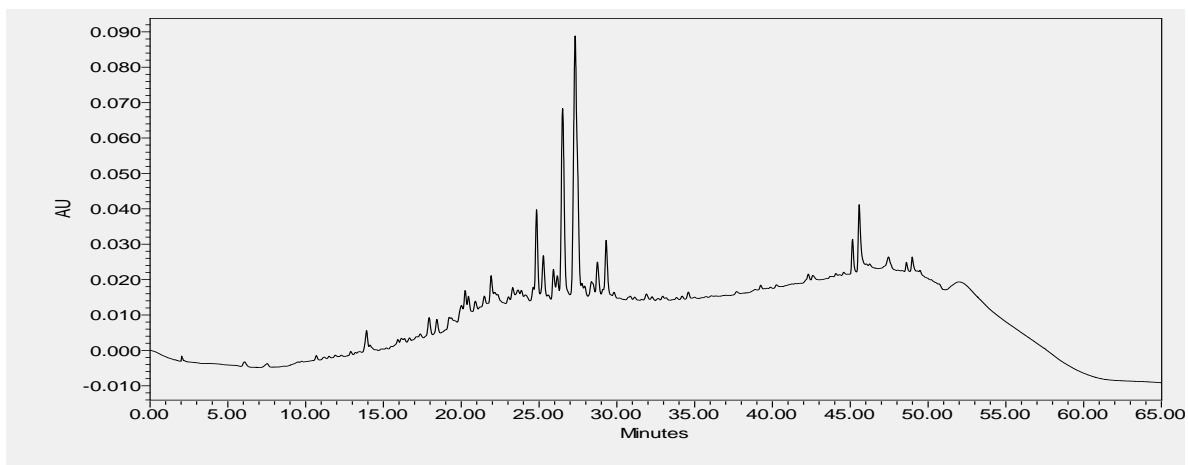


Figura 14. Cromatograma HPLC de la fracción 408 del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei*.

Su perfil cromatográfico generado mediante el método 2 (**Tabla 5, página 29**) fue prácticamente superponible con el de las dos fracciones anteriores reunidas, lo que determinó que se juntaran las 3 fracciones. El perfil cromatográfico de la fracción reunida se muestra en la **Figura 15**.

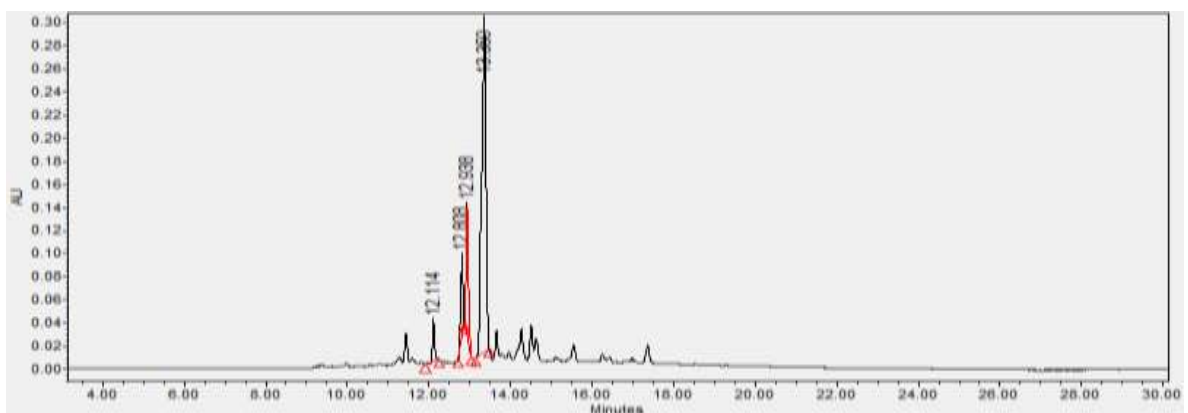


Figura 15. Cromatograma HPLC de la mezcla de las fracciones 406-408.

En este cromatograma, se pudo observar la presencia de 4 picos mayoritarios, pero lamentablemente, no se contaba con todos los estándares y no se logró la identificación de estos mediante HPLC-DAD.

7.3. Análisis de la mezcla de las fracciones 406 y 407 mediante HPLC-EM

Para comprobar la identidad de los compuestos antes mencionados en la mezcla de fracciones (**Figura 13**) e identificar el mayor número de los constituyentes químicos de la muestra formada por las 2 fracciones reunidas, estas se analizaron mediante HPLC-EM, utilizando las condiciones de la **Tabla 6, página 30**, y se obtuvo el cromatograma de la **Figura 16**.

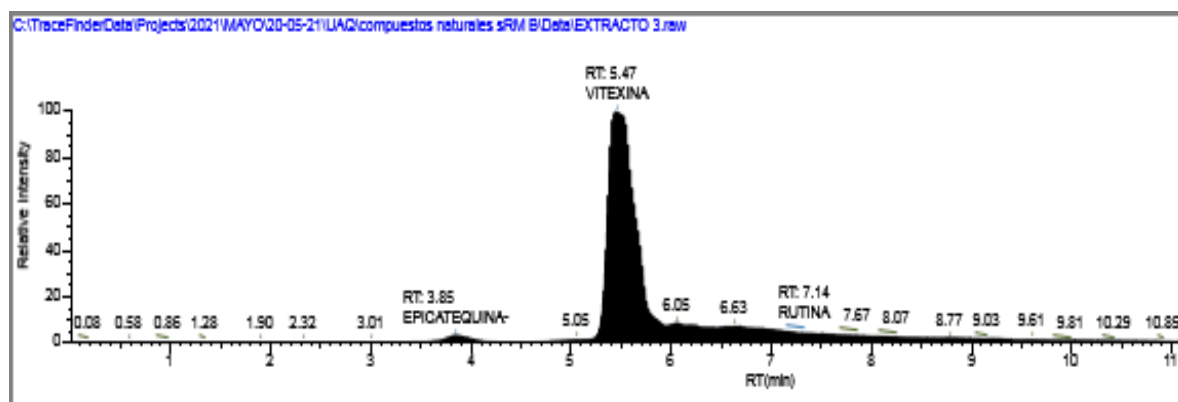


Figura 16. Cromatograma HPLC-EM de la mezcla de las fracciones 406 y 407.

En el cromatograma obtenido mediante HPLC-EM, se puede observar que la mezcla de fracciones efectivamente contiene los 3 compuestos identificados por la comparación de los TR y espectros UV-Vis experimentales y estándares auténticos, es decir, la epicatequina, la vitexina y la rutina.

- La (-)-epicatequina al igual que la (+)-catequina, tiene efecto de relajación vascular muy débil (Xu y col., 2007).
- La vitexina puede disminuir la presión arterial y ejercer un efecto antiinflamatorio. También, ejerce efectos de protección de la hipertrofia cardíaca e inhibe la agregación plaquetaria, la contractilidad vascular y la apoptosis (Che y col., 2016).
- La rutina es un flavonol con glicosilación en la posición 3-OH. Su efecto de relajación es muy débil. Esto puede ser debido a la presencia del voluminoso

disacárido rutinosa que causa impedimento estérico en la modificación del grupo 3-OH (Xu y col., 2007).

7.4. Fraccionamiento por CC de la mezcla de las fracciones 406-408

Una vez analizada la mezcla de las fracciones (406, 407 y 408), esta se pesó y se obtuvieron casi 2 gramos.

Después, se llevó a cabo su fraccionamiento mediante CC y se obtuvieron 245 fracciones, las cuales fueron agrupadas de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCF como se muestra en la **Tabla 8**.

En la misma tabla se puede observar que el sistema de elución comenzó con 100% de CH₂Cl₂ y terminó con CH₂Cl₂:MeOH (35:65), esto ocurrió ya que, al realizar las pruebas de solubilidad, las últimas fracciones resultaron ser insolubles en metanol y agua y no se continuó con la elución hasta agregar 100% metanol como se había contemplado en la metodología (ver **apartado 6.4.1.5., página 31**).

También cabe mencionar que el rendimiento de las fracciones agrupadas fue muy bajo y no se pudo determinar en la mayoría de los casos.

Tabla 8. Fracciones colectadas y agrupadas de la cromatografía en CC.

FASE MOVIL	FRACCIONES COLECTADAS	FRACCIONES AGRUPADAS	PESO (mg)
CH ₂ Cl ₂	1	1-3	ND*
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (95:05)	2-6		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (90:10)	7-20	7-15	ND
		16-20	ND
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (85:15)	21-115	27-38	ND
		48-53	ND
		54-60	ND
		70-104	ND
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (80:20)	116-125		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (75:25)	126-190	139-157	ND
		164-183	83.5
		184-205	48.7
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (65:35)	191-212		
		209-225	11.0
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (50:50)	213-229		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (35:65)	230-245		

*ND = No determinado.

7.4.1. Análisis cromatográfico de las fracciones colectadas mediante CCF

Se analizaron por separado algunas de las fracciones colectadas. Las fracciones con perfil cromatográfico relativamente más simple que el de las demás fueron de la fracción 164 a la 205. A continuación, se muestran los cromatogramas correspondientes a estas fracciones, las cuales fueron eluidas con CH₂Cl₂: MeOH (1:1) y como revelador se utilizó el sulfato cérico amoniacal (**Figura 17**).

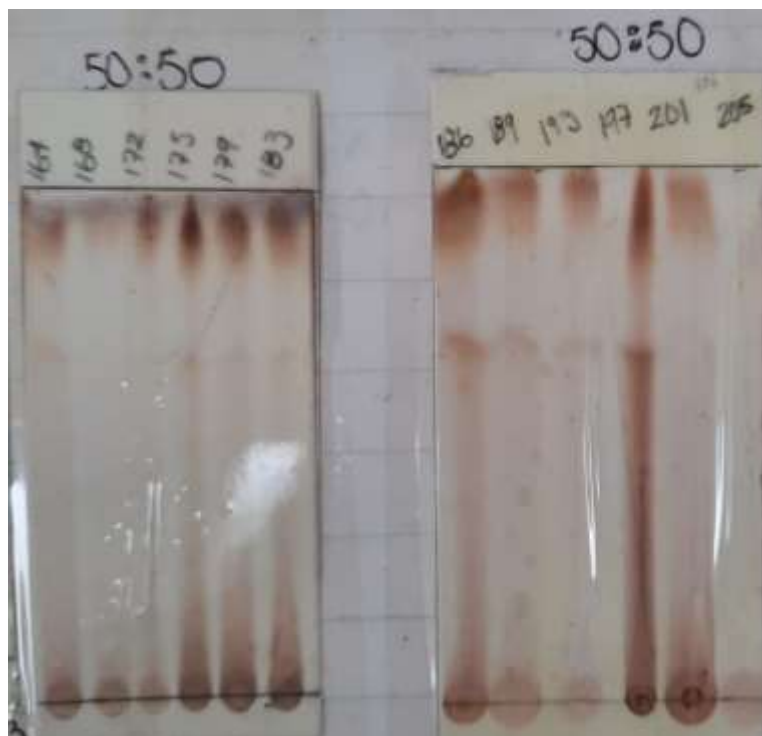


Figura 17. CCF de las fracciones 164 a la 205.

La mezcla de las fracciones 164-183 se analizó mediante RMN y la mezcla de las fracciones 184-205 se analizó mediante HPLC-EM.

7.4.2. Análisis de las fracciones secundarias mediante HPLC-EM

Al analizar la mezcla de las fracciones secundarias de la 164 a la 183 mediante HPLC-EM, se identificaron dos ácidos fenólicos y 11 flavonoides (**Figura 18**), los cuales se enlistan en la **Tabla 9**.

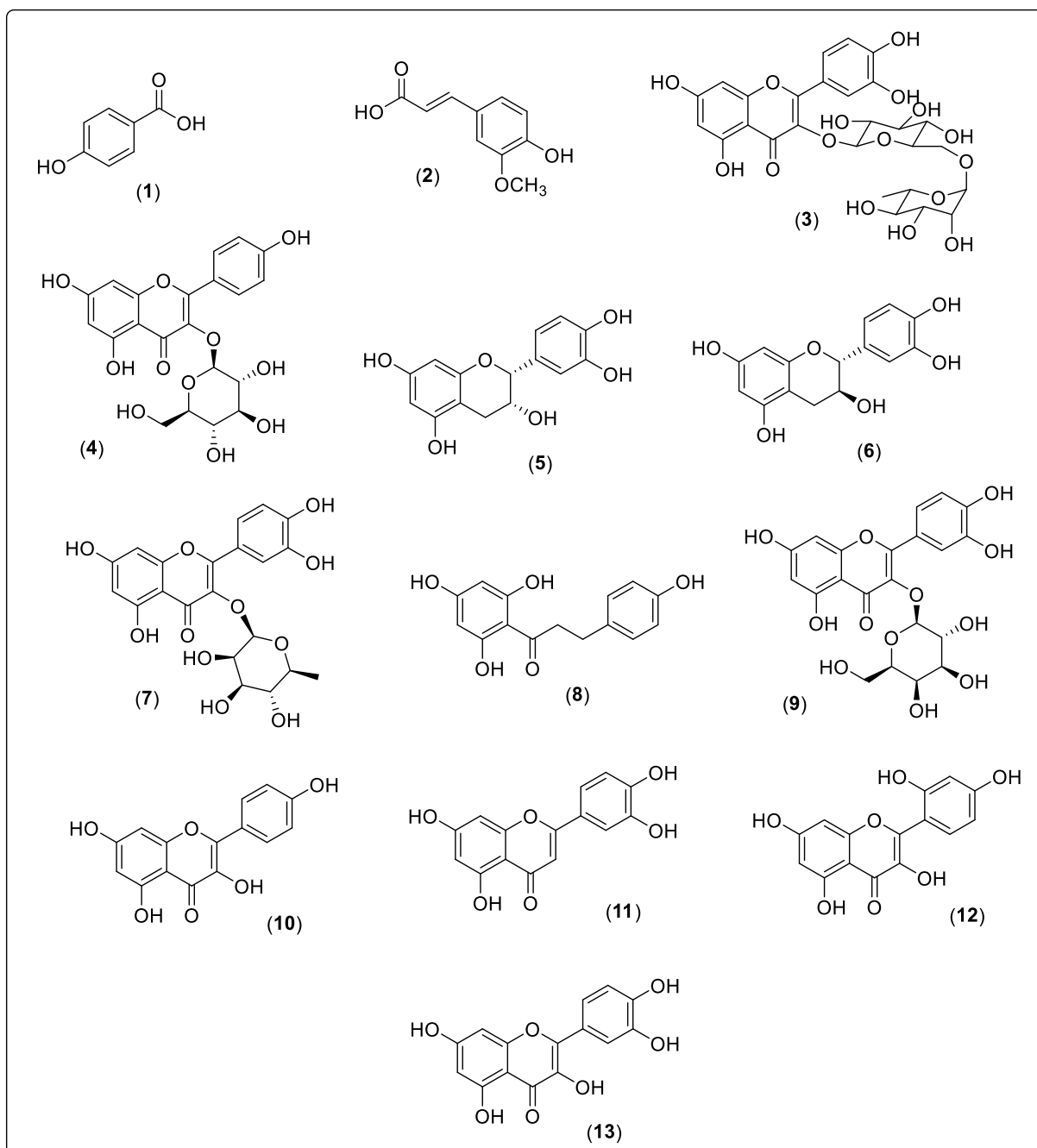


Figura 18. Compuestos identificados en la mezcla de las fracciones secundarias 164-183, mediante HPLC-EM.

Tabla 9. Compuestos identificados de la mezcla de las fracciones secundarias 164-183, mediante HPLC-EM.

Compuesto	TR (minutos)
ÁCIDOS FENÓLICOS	
Ácido 4-hidroxibenzoico (1)	6.14
Ácido ferúlico (2)	7.46
FLAVONOIDES	
Rutina (3)	6.10
Astragalina (4)	7.24
(-)-Epicatequina (5)	6.13
(+)-Catequina (6)	4.47
Quercitrina (7)	7.99
Floretina (8)	8.51
Hiperósido (9)	6.14
Kaempferol (10)	7.98
Luteolina (11)	9.65
Morina (12)	7.12
Quercetina (13)	9.74

- El ácido ferúlico (2) tiene efectos antihipertensivos, pero aún no se ha determinado con detalle sus efectos sobre la función vascular (Atsushi y col., 2007).
- La astragalina (4) es un flavonoide con efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antivirales, analgésicos, antibacterianos, antialérgicos y antihepatotóxicos, así como efectos procoagulantes *in vitro*. La astragalina puede reducir el tiempo de coagulación y aumentar el número de plaquetas *in vivo* (Li y col., 2020).

- Un estudio demostró que la quercitrina (**7**) inhibe la formación de trombos *in vivo* e *in vitro*; la quercitrina desempeña un papel crucial en el daño cerebral inducido por accidente cerebrovascular, debido a que puede ejercer potencialmente efectos antiplaquetarios y antitrombóticos, sin afectar la hemostasia (Oh y col., 2021).
- La floretina (**8**) es una chalcona que posee efectos antioxidantes (Stangl y col. 2005). Algunos resultados han mostrado que este compuesto tiene un efecto de relajación moderado. Tiene un anillo C roto y esto atenúa la coplanaridad de los anillos A y B. También carece de un doble enlace C(2)=C(3). Estas propiedades pueden explicar el hecho de que este compuesto no tiene una fuerte acción vascular cuando se prueba (Xu y col., 2007).
- El hiperósido (**9**) es el 3-O-galactosilquercetina que está ampliamente presente en las plantas de la familia Rosaceae, la cual incluye al género *Crataegus*. Ha recibido una amplia atención debido a sus efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antitumorales, antibacterianos y antivirales, anticoagulantes, antiplaquetarios e hipolipemiantes, hipoglucemiantes, así como efectos protectores sobre el sistema cardiovascular, el sistema nervioso, el sistema digestivo y el sistema inmunológico. En los últimos años, los efectos antidepresivos, antineurodegenerativos y protectores de los huesos, también han atraído la atención de la gente (Li y col., 2022).
- El kaempferol (**10**) pertenece a la clase de flavonoles, los cuales tienen un grupo OH en la posición C3. Tiene un solo grupo OH en el anillo B (posición B4) (Xu y col., 2007). Este se usa muy comúnmente en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades cardiovasculares, incluidas la trombosis, la hipertensión y la enfermedad de las arterias coronarias. También presenta efectos vasorrelajantes en varios vasos sanguíneos como la arteria coronaria porcina, la arteria pulmonar de rata y la aorta de rata (Mahobiya y col., 2018).

- La morina (**12**) es un polifenol con una estructura similar a la quercetina, que difiere solo en la posición de un grupo hidroxilo. Se aisló originalmente de miembros de la familia Moraceae y posteriormente de las hojas, frutos, tallos y ramas de numerosas plantas. Estudios han demostrado que la morina aumenta fuertemente la activación de la enzima eNOS, la producción de óxido nítrico y, por lo tanto, la relajación vascular (Taguchi y col., 2020).
- La quercetina (**13**) pertenece a los flavonoles, los cuales tienen un grupo OH en la posición C3 y tiene 2 grupos OH en el anillo B. Este flavonoide tiene actividad de relajación reducida en comparación con el kaempferol que solo tiene un grupo OH en el anillo B (Xu y col., 2007). Se ha demostrado que la quercetina inhibe, de forma dependiente de la dosis, la contracción de la aorta de rata inducida por fenilefrina de forma tanto dependiente, como independiente del endotelio. Este efecto inhibitorio puede ser bloqueado por el inhibidor de la óxido nítrico sintasa (Ke Chen C. y Pace-Asciak C. 1996).

7.5. Evaluación farmacológica de las fracciones

La mezcla de las fracciones 406 y 407 presentó un comportamiento bifásico, por lo que no se pudo calcular su efecto máximo (E_{max}) ni su concentración efectiva media (CE_{50}) exacta. Mientras que la eficacia del extracto metanólico libre de grasas y taninos (el que les dio origen a estas fracciones) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) ($83.58 \pm 5.21\%$) a la eficacia de la acetilcolina ($63.59 \pm 1.47\%$), la cual fue utilizada como referencia. Respecto a la CE_{50} , la de la acetilcolina fue de 69.21 (54.98-87.12) $\mu\text{g/mL}$ y la del extracto metanólico de 97.37 (54.43-174.2) $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 19 y Tabla 10**).

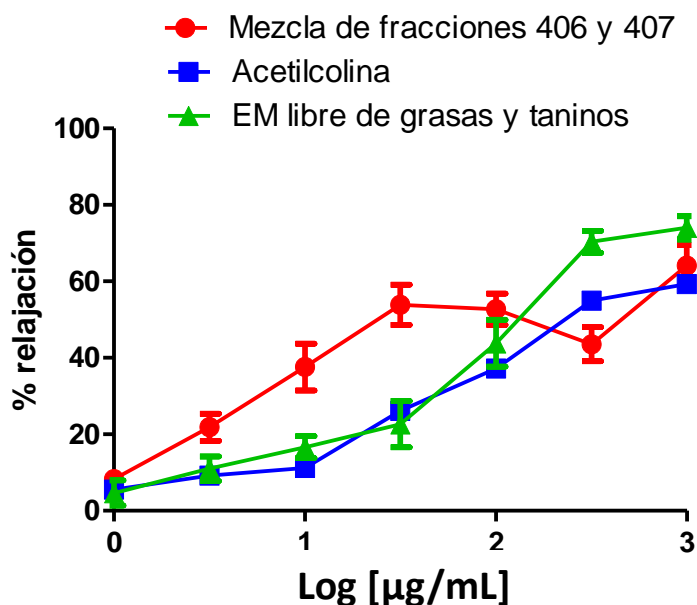


Figura 19. Curvas concentración-respuesta del ensayo farmacológico (mezcla de las fracciones 406 y 407).

Tabla 10. Valores de E_{max} (% relajación) y CE_{50} de la acetilcolina (ACh) y del extracto metanólico libre de grasas y taninos (EMLGT).

Muestra	E_{max} (% relajación)	CE_{50} (µg/mL)	Potencia relativa: [CE_{50} muestra/[ACh]]
ACh	63.59 ± 1.47	69.21 (54.98-87.12)	1
EMLGT	83.58 ± 5.21	97.37 (54.43-174.2)	1.40 veces menos potente que la ACh

Después, se evaluó la mezcla de las 3 fracciones de interés (406, 407 y 408) y los resultados obtenidos de esta evaluación farmacológica mostraron que la mezcla de fracciones relajó la aorta de manera dependiente de la concentración, obteniendo así una eficacia de $65.86 \pm 3.67\%$, mientras que la eficacia del extracto metanólico libre de grasas y taninos (EMLGT) (el que le dio origen a estas fracciones) fue

significativamente mayor ($p < 0.05$) ($E_{max} = 83.58 \pm 5.21\%$) y fue muy similar a la eficacia de la acetilcolina ($63.59 \pm 1.47\%$) (**Figura 20 y Tabla 11**).

Respecto a la CE_{50} , la mezcla de fracciones presentó 1.32 ($0.21-8.26$) $\mu\text{g/mL}$ significativamente menor ($p < 0.05$) a la CE_{50} de la acetilcolina 69.21 ($54.98-87.12$) $\mu\text{g/mL}$) y a la CE_{50} del extracto metanólico 97.37 ($54.43-174.2$) $\mu\text{g/mL}$.

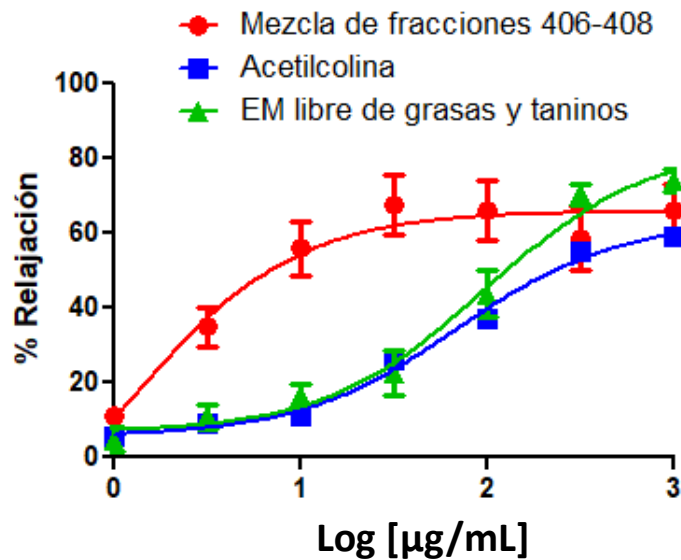


Figura 20. Curvas concentración-respuesta del ensayo farmacológico (mezcla de las fracciones 406-408).

Tabla 11. Valores de E_{max} (% relajación) y CE_{50} de la acetilcolina (ACh), del extracto metanólico libre de grasa y taninos (EMLGT) y de la mezcla de las fracciones 406-408.

Muestra	E_{max} (% relajación)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Potencia relativa: [CE_{50} muestra/[ACh]
ACh	63.59 \pm 1.47	69.21 (54.98-87.12)	1
EMLGT	83.58 \pm 5.21	97.37 (54.43-174.2)	1.40 veces menos potente que la ACh
Mezcla de fracciones 406-408	65.86 \pm 3.67	1.32 (0.21-8.26)	52.4 veces más potente que la ACh y 73.8 que el EMLGT

8. CONCLUSIONES

- Las fracciones más polares del extracto metanólico de las hojas de *Crataegus rosei* presentaron actividad vasodilatadora. La CE_{50} de las fracciones fue mucho menor a la de la ACh, utilizada como control positivo, y a la del EMLGT que les dio origen a estas fracciones. Sin embargo, la eficacia de las fracciones fue muy similar a la de la ACh y menor a la del EMLGT.
- La miricetina, un flavonoide identificado en la mezcla de las fracciones 406-408, se ha reportado con comportamiento bifásico dependiente de la concentración. Por lo tanto, su presencia en las fracciones justifica, al menos en parte, el comportamiento observado.
- De los 13 compuestos fenólicos identificados en las fracciones secundarias, 8 han sido reportados con efectos vasorrelajantes.
- Contrariamente a lo esperado, el EMLGT conservó una mayor actividad vasodilatadora que sus fracciones más polares, reflejando la importancia de utilizar los extractos con su composición química completa para un posible tratamiento de la hipertensión.

9. REFERENCIAS

- Abarca-Vargas R. Petricevich V. **2018**. Importancia biológica de los compuestos fenólicos. *Inventio*. 14(34): 33-38.
- Abuashwashi M., Palomino O., Gómez-Serranillos M. **2016**. Geographic origin influences the phenolic composition and antioxidant potential of wild *Crataegus monogyna* from Spain. *Pharmaceutical Biology*. 54(11): 2708-2713.
- Alirezalu A., Ahmadi N., Salehi P., Sonboli A., Alirezalu K., Khaneghah A., Lorenzo J. **2020**. Physicochemical characterization, antioxidant activity and phenolic compounds of Hawthorn (*Crataegus* spp.) Fruits species for potential use in food applications. *Foods*. 9(4): 436.
- Alonso J. **2003**. Bosques y selvas tropicales como fuente de medicamentos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2(2): 16-21.
- Atsushi S., Masaki Y., Hiroko J., Akihiko F., Ichiro T., Tadashi H., Ikuo S. **2007**. Ferulic acid restores endothelium-dependent vasodilation in aortas of spontaneously hypertensive rats. *The American Journal of Hypertension*. 20: 508-513.
- Álvarez E., Orallo F. **2003**. Actividad biológica de los flavonoides (II). Acción cardiovascular y sanguínea. *Bioquímica*. 22: 103-104.
- Ávila-Uribe M., García-Zárate S., Sepúlveda-Barrera A., Godínez-Rodríguez M. **2016**. Medicinal plants in two towns of the San Martín de las Pirámides municipality, state of Mexico. *Polibotánica*. 42: 215-245. Profile of *Crataegus* spp.: a systematic review. *Drug Safety*. 29(6): 523-535.
- Cruz-Aranda J. **2019**. Manejo de la hipertensión arterial en el adulto mayor. *Medicina Interna de México*. 35(4): 515-524.
- Bubik M., Willer E., Bihari P., Jürgenliemk G., Ammer H., Krombach F., Fürst R. **2012**. A novel approach to prevent endothelial hyperpermeability: the *Crataegus* extract WS 1442 targets the cAMP/Rap1 pathway. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 52(1): 196-205.

- Castro-Juárez J., Cabrera-Pivaral C., Ramírez-García S., García-Sierra L., Morales-Pérez L., Ramírez-Concepción H. **2018**. Factores de riesgo para enfermedad cardiovascular en adultos mexicanos. *Revista Médica*. 9(2): 152-162.
- Cervantes-Paz B., Ornelas-Paz J., Gardea-Béjar A., Yahia E., Rios-Velasco C., Zamudio-Flores P., Ruiz-Cruz S., Ibarra-Junquera V. **2018**. Compuestos fenólicos de tejocote (*Crataegus* spp.): su actividad biológica asociada a la protección de la salud humana. *Revista Fitotecnica Mexicana*. 41(3): 339–349.
- Che X., Wang X., Zhang J., Peng C., Zhen Y., Shao X., Zhang G., Dong L. **2016**. Vitexin exerts cardioprotective effect on chronic myocardial ischemia/reperfusion injury in rats via inhibiting myocardial apoptosis and lipid peroxidation. *American Journal of Translation Research*. 8(8): 3319-3328.
- Clínic Barcelona. 2022. ¿Qué es la cardiopatía isquémica, infarto o angina de pecho? [En línea] Disponible en: <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/cardiopatia-isquemica>. Fecha de consulta: 2 de marzo de 2022.
- Coskun O. **2016**. Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*. 3(2): 156–160.
- Defilippo Giovanni. **2018**. Tipos de infarto de miocardio. [En línea] Disponible en: <https://www.fisioterapiaparatodos.com/tipos-de-infarto-de-miocardio/> Fecha de consulta: 2 de marzo de 2022.
- Dong P., Pan L., Zhang X., Zhang W., Pan L., Zhang X. **2017**. Hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge) leave flavonoids attenuate atherosclerosis development in apoE knock-out mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 198: 479-488.
- Flórez J. **2014**. Farmacología humana. España: Elsevier Masson.
- Franco-Mora O., Aguirre-Ortega S., Morales-Rosales E., González-Huerta A., Gutiérrez-Rodríguez F. **2010**. Caracterización morfológica y bioquímica de frutos de tejocote (*Crataegus mexicana* DC.) de Lerma y Ocoyoacac, México. *Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva*. 17(1): 61-66.
- Fürst R., Zirrgiebel U., Totzke F., Zahler S., Vollmar A., Koch E. **2010**. The *Crataegus* extracts WS 1442 inhibits balloon catheter-induced intimal hiperplasia in the rat

- carotid artery by directly influencing PDGFR- β . *Artherosclerosis*. 211 (2): 409-417.
- Gheno-Heredia Y., Nava-Bernal A., Martínez C., Sánchez V. **2011**. Las plantas medicinales de la organización de parteras y médicos indígenas tradicionales de Ixhuatlancillo, Veracruz, México y su significancia cultural. *Polibotánica*. 31: 191-251.
- Gibbons S. **2006**. An introduction to planar chromatography. In Natural products isolation. Second edition. Humana Press. 77-78.
- Gimenez-Serrano S. **2004**. Angina de pecho. *Revista Farmacia Profesional*. 18(9): 52-58.
- González-Benito F. **2016**. Técnicas de separación. Cromatografía. [En línea] Disponible en: http://ocw.uc3m.es/cursos-archivados/caracterizacion-de-materiales/material-de-clase-1/Tecnicas_de_separacion_cromatografica.pdf. Fecha de la consulta 5 octubre 2020.
- González-Guzmán R., Alcalá-Ramírez J. **2010**. Enfermedad isquémica del corazón, epidemiología y prevención. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 53 (5): 35-43.
- Hernández-Pérez A., Bah M., Ibarra-Alvarado C., Rivero-Cruz J., Rojas-Molina A., Rojas-Molina J. Cabrera-Luna J. **2014**. Aortic relaxant activity of *Crataegus gracilior* Phipps and identification of some of its chemical constituents. *Molecules*. 19: 20962-20974.
- Hernández-Ramírez A. **2020**. *Libellus de medicinalibus indorum herbis*: Códice Cruz-Badiano. *Cuadernos de Biodiversidad*. 58: 1-8.
- IAM-Salud Mx. **2017**. Infarto Agudo al Miocardio. [En línea] Disponible en: http://www.calidad.salud.gob.mx/site/iam/docs/iam_01.pdf. Fecha de consulta 5 octubre de 2020.
- Ibarra-Alvarado C., Rojas A., Mendoza S., Bah M., Gutiérrez D., Hernández-Sandoval L., Martínez M. **2010**. Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmaceutical Biology*. 48 (7): 732-739.

- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). **2021**. Estadística de defunciones registradas de enero a junio de 2021. [En línea] Disponible en: CARACTERÍSTICAS DE LAS DEFUNCIONES REGISTRADAS EN MÉXICO (inegi.org.mx). Fecha de consulta: 19 de julio de 2022.
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). **2020**. Plantas medicinales, tradición ancestral. [En línea] Disponible en: <https://www.gob.mx/inifap/articulos/plantas-medicinales-tradicion-ancestral>. Fecha de consulta 22 enero 2021.
- Kaur P., Muthuraman A., Kuar M. **2015**. The implications of angiotensin-converting enzyme and their modulation. *ACS Chemical Neuroscience*. 6(4): 508-521.
- Ke Chen C. Pace-Asciak C. **1996**. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *Pharmacology*. 27(2). 363-366.
- Kumar D., Arya V., Bhat Z., Khan N., Prasad D. **2012**. The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives. *Revista Brasileira Farmacognosia*. 22(5): 1187-1200.
- Laurent S. **2017**. Antihypertensive grugs. *Pharmacological Research*. 124: 116-125.
- Li C., Hu M., Jiang S., Liang Z., Wang J., Liu Z., Wang H., Kang W. **2020**. Evaluation procoagulant activity and mechanism of astragalin. *Molecules*. 25(177): 1-16.
- López-Fitz D. **2019**. Evaluación de la actividad vasorrelajante de los extractos metanólicos obtenidos a partir de las hojas de *Crataegus rosei* y caracterización química de algunos de sus metabolitos secundarios. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
- López-Santiago J., Nieto-Ángel R., Barrientos-Priego A., Rodríguez-Pérez E., Colinas-Leon M., Borys M., Gozález-Andrés F. **2008**. Selección de variables morfológicas para la caracterización del tejocote (*Crataegus* spp.). *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 14(2): 97-111.
- Mahobiya A., Uttam Singh T., Rungsung S., Kumar T., Chandrasekaran G., Parida S., Kumar D. **2018**. Kaempferol-induces vasorelaxation via endothelium-independent pathways in rat isolated pulmonary artery. *Pharmacological*. 70(5): 863-874.

- MedlinePlus. Medicamentos antihipertensivos. [En línea] Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/007484.htm>. Fecha de consulta 25 de enero de 2023.
- Muñoz-Garmendia F., Navarro C., Aedo C. **1992**. *Crataegus*. [En línea] Disponible en: http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/06_087_22%20Crataegus.pdf. Fecha de consulta: 17 septiembre 2020.
- Núñez-Colín C., Nieto-Ángel R, Barrientos-Priego A, Segura S, Sahagún-Castellanos J., González-Andrés F. **2008a**. Distribución y caracterización eco-climática del género *Crataegus* L. (Rosaceae, SUBFAM. Maloideae) en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 14(2): 177-184.
- Núñez-Colín C., Nieto-Ángel R., Barrientos-Priego A., Sahagún-Castellanos J., Segura S., González-Andrés F. **2008b**. Variability of three regional sources of germplasm of tejocote (*Crataegus* spp.) from central and southern Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 55: 1159-1165.
- Núñez-Colín C., Hernández-Martínez M. **2011**. La problemática en la taxonomía de los recursos genéticos de tejocote (*Crataegus* spp.) En México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2(1):141-153.
- Núñez-Colín C., Escobedo-López D., Hernández-Martínez M., Ortega-Rodríguez C. **2012**. Modelos de las zonas adecuadas de adaptación del tejocote (*Crataegus mexicana* DC.) por efecto del cambio climático. *Agronomía Mesoamericana*. 23(2): 241-246.
- Oh T., Do H., Jeon J., Kim K. **2021**. Quercitrin inhibits platelet activation in arterial thrombosis. *Phytomedicine*. 80: 153363.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). **2019**. Enfermedad según la OMS. [En línea] disponible en: <https://www.significados.com/enfermedad/>. Fecha de consulta: 2 marzo 2022.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). **2020**. The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Fecha de consulta: 13 mayo 2021.

- Pawlaczyk-Graja I. **2018**. Polyphenolic-polysaccharide conjugates from flowers and fruits of single-seeded hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.): Chemical profiles and mechanisms of anticoagulant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 116: 869-879.
- Pérez-Lainez M., García-Mateos M. **2014**. Perfil fitoquímico del aceite esencial del futo de tejocote mexicano (*Crataegus* spp.). Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Red de viveros de biodiversidad (www.revivemx.org). Tejocote, *Crataegus Mexicana*. [En línea] Disponible en: https://revivemx.org/Recursos/Fichas_propagacion/FichaPropagacion_F1_Crataegus_mexicana_Tejocote_v2.pdf. Fecha de consulta 30 de noviembre de 2022.
- Rocha-Salavarieta P. **2006**. Biotecnología en plantas medicinales y aromáticas. [En línea] disponible en: https://www.academia.edu/27621407/Biotecnolog%C3%ADa_en_Plantas_Medicinales_y_Arom%C3%A1ticas. Fecha de consulta 22 enero de 2021.
- Romero-Cerecero O., Tortoriello-García J. **2006**. Conocimiento sobre fitomedicamentos entre médicos del segundo nivel de atención. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 45(5): 453-458.
- Sarker S., Nahar L. **2012**. An introduction to natural products isolation. In Natural products isolation. Third edition. Humana Press. 9-10.
- Saturno-Chiu G. **2017**. Cardiología. 1ra. Edición. Editorial El Manual Moderno. México.
- Si H., Wyeth R., Liu D. **2014**. The flavonoid luteolin induces nitric oxide production and arterial relaxation. *Nutrition*. 53(1): 269-275.
- Solís Tobón Manuel. **2015**. Estudio de las posibles conformaciones de los flavonoides quercetina y dihidroquercetina por métodos de mecánica cuántica. Tesis de licenciatura en física. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Stangl V., Lorenz M., Ludwig A., Grimbo N., Guether C., Sanad W., Ziemer S., Martus P., Baumann G., Stangl K. **2005**. The flavonoid phlorentin suppresses

- stimulated expression of endotelial adhesión molecules and reduces activation of human platelets. *Nutrition*. 135: 172-178.
- Taguchi K., Tano I., Kaneko N., Matsumoto T., Kobayashi T. **2020**. Plant polyphenols morin and quercetin rescue nitric oxide production in diabetic mouse aorta through distinct pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 129: 1100463.
- Talha M. 2020. Mass spectrometry. [En línea] Disponible en: (PDF) espectrometría de masas. (researchgate.net). Fecha de consulta: 6 de diciembre de 2022.
- Tellez O., Mattana E., Diazgranados M., Kühn N., Castillo-Lorenzo E., Lira R., Montes-Leyva L., Rodríguez I., Flores-Ortiz C., Way M., Dávila P., Ulian T. **2020**. Native tres of Mexico: diversity, distribution, uses and conservation. [En línea] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7505059/>. Fecha de consulta: 15 de junio de 2021.
- Torres-Ortiz D., Rodríguez-deLeón E., Bah M., Ibarra-Alvarado C., Mercado-Silva E., Castro-Ortiz J., Rivera-Pastrana D. **2019**. Vasorelaxing effect and possible chemical markers of the flowers of the mexican *Crataegus gracilior*. *Natural Product Research*. 57(4): 646-647.
- Ulloa C., Acevedo-Rodríguez P., Beck S., Belgrano M., Bernal R., Berry P., Brako L., Celis M., Davise G., Forzza R., Gradstein R., Hokche O., León B. León-Yáñez S., Magill R., Neill D. Nee M., Cuervo P., Stimmel H. Fuerte M., Villaseñor J., Zarucchi J., Zuloaga F., Jørgensen P. **2017**. An integrated assessment of vascular plant species of the Americas. *Science*. 358: 1614-1617.
- Wang J., Xiong X., Feng B. **2013**. Effect of *Crataegus* usage in cardiovascular disease prevention: an evidence-based approach, evidence-based complementary and alternative. *Medicine*. 2013: 16.
- Wang L., Lu Z., Hou L. **2010**. Chemical constituent, pharmacological effects and clinical application of *Crataegus pinnatifida*. *Strait Pharmacology*. 3: 75–78.
- Wu J., Peng W., Qin R., Zhou H. **2014**. *Crataegus pinnatifida*: chemical constituents, pharmacology, and potential applications. *Molecules*. 19: 1685-1712.

- Xu Y., Leung S., Yeung D., Hu L., Chen G., Che C., Man R. **2007**. Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry*. 68(8): 1179-1188.
- Yang B., Liu P. **2012**. Composition and health effects of phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus* spp.) of different origins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(8):1578–1590.
- Zorniak M., Szydło B., Krzeminski T. **2017**. *Crataegus* special extract WS® 1442: up-to-date review of experimental and clinical experiences. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 68(4): 521-526.