



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

ACTIVIDAD VASORRELAJANTE EN AORTA AISLADA DE RATA Y  
CONSTITUYENTES TRITERPÉNICOS DE EXTRACTOS DE *Crataegus gracilior*  
PHIPPS (ROSACEAE)

**TESIS**

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

**PRESENTA**

Q.F.B. ABIGAIL HERNÁNDEZ PÉREZ

Exp. 231328

**DIRIGIDA POR**

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, MÉXICO.

NOVIEMBRE, 2014.



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

Actividad vasorrelajante en aorta aislada de rata y constituyentes triterpénicos de extractos de *Crataegus gracilior* Phipps (ROSACEAE)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

PRESENTA  
Q.F.B. ABIGAIL HERNÁNDEZ PÉREZ

DIRIGIDA POR  
Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

Dr. Mamadou Moustapha Bah  
Director

Dr. César Ibarra Alvarado  
Sinodal

Dra. Alejandra Rojas Molina  
Sinodal

Dr. José Fausto Rivero Cruz  
Sinodal

Dra. Guadalupe García Alcocer  
Sinodal

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad

  
Firma  
Firma

Alejandra Rojas M  
Firma

  
Firma  
Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro. México  
Noviembre, 2014

## RESUMEN

En México como en el mundo, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte entre la población adulta. La hipertensión arterial (HTA) es un factor importante para el desencadenamiento de dichas enfermedades. Actualmente, más de la tercera parte de la población mexicana es afectada por esta patología. Una de las estrategias para prevenir y/o tratar esas enfermedades consiste en buscar plantas medicinales con contenidos químicos adecuados y propiedades farmacológicas comprobables. *Crataegus* es un género ampliamente distribuido en todo el mundo y muchas de sus especies han sido utilizadas en la medicina tradicional para tratar la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares, debido principalmente a su alto contenido de compuestos fenólicos, específicamente del tipo flavonoide. De hecho, hoy en día existen algunos extractos estandarizados (LI132 y WS1442®) obtenidos a partir de hojas y flores de *Crataegus* spp., los cuales son comercializados para ese mismo fin. La presente investigación se centró en la evaluación de la actividad vasorrelajante sobre aorta aislada de rata de los extractos acuosos y orgánicos obtenidos a partir de los frutos y hojas de *C. gracilior*, así como en la purificación e identificación de algunos de los metabolitos secundarios mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas. Los resultados mostraron que el extracto metanólico posee un efecto vasorrelajante significativamente más potente y eficaz que los demás extractos evaluados (obtenidos con agua, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y hexano), con una CE<sub>50</sub> de 8.69 ± 4.34 µg/mL y un E<sub>máx</sub> de 94.6 ± 5.38 %. Aunque se habían caracterizado previamente compuestos fenólicos a partir de este mismo extracto, en el presente trabajo se aislaron dos triterpenos, los cuales se han identificado como ácido ursólico y ácido corosólico, mediante la comparación de sus datos de RMN con los reportados en la literatura. La actividad vasodilatadora de los compuestos identificados en el presente trabajo ha sido previamente descrita en diferentes trabajos y por lo tanto pueden justificar, al menos en parte, el uso tradicional sostenido de esta especie vegetal.

**Palabras clave:** *Crataegus gracilior*, aorta, vasodilatación, triterpenos.

## SUMMARY

In Mexico, as in the rest of the world, cardiovascular diseases are the main cause of death among adults. Hypertension (HT) is an important factor that triggers such diseases. Currently, more than a third of the Mexican population suffers from HT. In the scientific field related to natural products, one strategy to prevent and/or treat these diseases is the search for medicinal plants that contain suitable chemical constituents and possess ascertainable pharmacological properties. *Crataegus* is a genus widely distributed around the world and many of its species have been used in traditional medicine to treat cardiovascular diseases, mainly due to their contents of phenolic compounds, flavonoids being the most important among them. In fact, two standardized extracts (LI132 and WS1442®) obtained from leaves and flowers of *Crataegus* spp. are nowadays marketed for the same purpose. This study focused on the assessment of the vasorelaxant activity of the organic and aqueous extracts obtained from fruits and leaves of *C.gracilior* on isolated rat aorta, and on the purification and identification of some of their secondary metabolites by the use of chromatographic and spectroscopic techniques. The results obtained showed that the methanol extract has a significantly more potent and effective vasorelaxant effect than the other tested extracts, with an  $EC_{50} = 8.69 \pm 4.34 \mu\text{g/mL}$  and an  $E_{\text{max}} = 94.6 \pm 5.38\%$ , values that are comparable to those obtained for acetylcholine used as positive control. Despite the previous identification of phenolic compounds in this species in our lab, from the same extract we isolated two triterpene compounds, which were identified as ursolic and corosolic acids by comparison of their NMR spectroscopic data with those reported in the literature. All these compounds have already been proven to possess on their own antihypertensive effect and other benefits on cardiovascular diseases and they can support, at least in part, the traditional use of this plant species.

**Key words:** *Crataegus gracilior*, aorta, vasorelaxation, triterpenes.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres (Cecilia Pérez y Concho Hernández), por ayudarme a dar los primeros pasos en este camino de la vida, porque son ellos los pioneros en formar mi ser y mi persona, por su entusiasmo por sacar adelante a sus hijos y por todos los valores que me han enseñado, ya que estos han sido el pilar para mi formación académica.

A mis hermanas Adriana, Claudia y Elizabeth, todas me han enseñado la fuerza femenina para no detenerme aún en las circunstancias más adversas. Bene, muchas gracias por tu apoyo incondicional, si algún día lo tuviera que pagar solo me bastaría una eternidad.

A cada uno de mis hermanos, que por razones conocidas no enlistare aquí, pero que siempre han sido mi fuerza y aprendizaje para seguir adelante. Cada momento compartido con ustedes es una recarga de energía para mi cuerpo muchas veces agotado. Juan Charly, gracias por ser tan generoso, tu apoyo lo agradeceré siempre.

En general, a mi toda mi familia. Mis sobrinos son la esperanza de muchas de mis ilusiones y sus eternas sonrisas la inocencia que se necesita para seguir de pie.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y tecnológica CONACYT - Gobierno del Estado de Querétaro (FOMIX-QRO) convocatoria 2012-01, por el proyecto: "Fortalecimiento de la infraestructura del posgrado en Ciencias Químico Biológicas de la UAQ para la formación de recursos humanos de alto nivel en las áreas de farmacia y salud". Clave: QRO-2012-C01-192954.

Al Dr. Moustapha, por compartir conmigo este proyecto y porque a pesar de mis tropiezos, siempre creyó en mí. Gracias por todos sus consejos, asesorías y hasta por sus regaños porque todos me han servido para seguir creciendo como investigadora.

A cada uno de mis sinodales, por sus sugerencias y comentarios que sin duda sirvieron para enriquecer este trabajo y por todas las prestaciones otorgadas para llevar a cabo este proyecto. A la Dra. Alcocer, por su valioso tiempo en la revisión de este trabajo y por todos sus consejos entusiastas que me ayudaron a nunca rendirme.

A mis compañeras de maestría, por todo el conocimiento compartido, por sus críticas constructivas y por todos los momentos que compartimos juntas. Aprendí mucho de ustedes.

A todos mis amigos, porque su compañía fue la mejor forma para el alivio del estrés interminable. A mis compañeros de laboratorio, por su apoyo en la realización de gran parte de este trabajo, por sus experiencias y recomendaciones.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Hipertensión arterial (HTA).....	4
2.1.1. Características y factores de riesgo de la HTA.....	4
2.1.2. Datos estadísticos de la HTA.....	4
2.1.3. Mecanismos innatos para la regulación de la HTA.....	5
2.1.4. Tratamientos convencionales de la HTA.....	7
2.1.5. El sistema vascular y su importancia en la HTA.....	9
2.1.5.1. Función del endotelio vascular.....	10
2.1.5.2. Función del músculo liso vascular.....	11
2.1.5.3. Control del tono de la célula del músculo liso vascular.....	13
2.2. Compuestos vasodilatadores derivadores de plantas.....	14
2.2.1. Vasodilatación mediada por la activación de la vía del NO/GMPc.....	15
2.3. El género <i>Crataegus</i> .....	16
2.3.1. Historia y usos tradicionales de <i>Crataegus</i> spp.....	16
2.3.2. Distribución geográfica.....	18
2.3.3. Descripción botánica breve.....	19
2.3.4. Metabolitos secundarios identificados en <i>Crataegus</i> spp.....	20
2.3.4.1. Compuestos fenólicos identificados en <i>Crataegus</i> spp.....	20
2.3.4.2. Terpenoides.....	25
2.3.4.2.1. Clasificación de los terpenoides.....	26
2.3.4.2.2. Biosíntesis de terpenoides.....	26
2.3.4.2.3. Biosíntesis de triterpenos.....	27
2.3.4.2.4. Función biológica de los terpenoides.....	30
2.3.5. Extractos estandarizados de <i>Crataegus</i> spp.....	32
2.3.6. Estudios sobre las actividades farmacológicas de <i>Crataegus</i> spp.....	32

2.3.7. Estudios sobre la eficacia y seguridad de <i>Crataegus</i> spp. ....	37
3. JUSTIFICACIÓN.....	39
4. HIPOTÉISIS.....	40
5. OBJETIVOS.....	40
5.1. Objetivo general .....	40
5.2. Objetivos particulares .....	40
6. METODOLOGÍA .....	41
6.1. Recolección y conservación del material vegetal .....	41
6.2. Obtención de los extractos .....	41
6.2.1. Extractos de las hojas secas .....	41
6.2.2. Extractos de los frutos frescos.....	41
6.3. Evaluación de la actividad vasorrelajante <i>ex vivo</i> .....	42
6.3.1. Preparación de los extractos .....	42
6.3.2. Ensayo farmacológico .....	42
6.3.3. Análisis estadísticos en los ensayos farmacológicos .....	43
6.4. Estudios químicos .....	43
6.4.1. Fraccionamiento a gran escala del extracto MMH.....	43
6.4.2. Análisis cromatográfico de las fracciones mediante CCF.....	44
6.4.3. Preparación del agente revelador.....	44
6.4.4. Determinación de ácido ursólico mediante CCF.....	44
6.4.5. Purificación de compuestos .....	44
6.4.6. Identificación de los compuestos purificados.....	45
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	46
7.1. Rendimiento de los extractos .....	46
7.2. Evaluación farmacológica de los extractos.....	46
7.3. Estudios químicos .....	49
7.3.1. Fraccionamiento a gran escala del extracto MMH.....	49
7.3.2. Análisis cromatográfico de las fracciones mediante CCF.....	51
7.3.3. Determinación de ácido ursólico.....	52
7.5. Evaluación farmacológica de las fracciones .....	53
7.6. Purificación de compuestos.....	55

7.7. Identificación de compuestos purificados .....	57
8. CONCLUSIONES .....	63
9. REFERENCIAS .....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Mecanismos innatos para la regulación de la HTA .....	6
2. Anatomía de la arteria vascular .....	10
3. Regulación de la concentración de calcio en la célula de músculo liso vascular y contracción dependiente de la ATPasa de la actomiosina.....	12
4. Mecanismo de relajación mediado por la vía del NO-GMPc.....	16
5. Distribución geográfica del género <i>Crataegus</i> en México.....	18
6. Distribución geográfica de <i>C. gracilior</i> y <i>C mexicana</i> en el bajío y zonas adyacentes.....	19
7. Procianidinas identificadas en <i>C. grayana</i> .....	23
8. Estructuras básicas de las unidades biosintéticas de terpenos y del tipo de unión de las mismas.....	26
9. Clasificación de los terpenoides .....	27
10. Secuencia de ciclizaciones y movimientos de Wagner-Meerwein de H <sup>-</sup> y Me <sup>-</sup> para la generación de diversos derivados .....	28
11. Curvas concentración-respuesta generadas por los diferentes extractos de <i>C.</i> <i>gracilior</i> .....	47
12. Cromatogramas en capa fina de las fracciones F8 y F9 .....	51
13. Cromatogramas comparativos de los diferentes extractos y el ácido ursólico	52
14. Cromatograma que ilustra la presencia del ácido ursólico en la fracción F8	52
15. Curvas concentración-respuesta generadas por las fracciones F8 y F9 .....	54
16. Perfil del cromatograma a nivel preparativo que permitió aislar algunos de los constituyentes de la fracción F8.....	55
17. Análisis mediante CCF de la homogeneidad de las 3 bandas recuperadas de la CCFP de la fracción F8.....	56
18. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) del compuesto AB2 .....	58
19. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz) (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) del compuesto AB2. ....	59
20. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto AB2 identificado como ácido ursólico ...	59
21. Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto AB2 identificado como ácido ursólico..	60
22. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto AB3 identificado como ácido corosólico	60

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
1. Rendimiento de los extractos obtenidos de hojas y frutos de <i>C. gracilior</i> .....	46
2. Valores de $E_{m\acute{a}x}$ y $CE_{50}$ obtenidos a partir de CCR de los diferentes extractos de <i>C. gracilior</i> .....	47
3. Resumen de las condiciones experimentales de fraccionamiento a gran escala del extracto MMH .....	50
4. Constantes espectroscópicas comparativas del compuesto AB2 .....	61
5. Constantes espectroscópicas comparativas del compuesto AB3 .....	62

## 1. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional se considera, según la OMS, como la suma total de conocimientos, habilidades y prácticas, todos basados en teorías, creencias y experiencias oriundas de las diferentes culturas, sean o no explicables, y que se utilizan para mantener la salud, así como para prevenir, diagnosticar o tratar las enfermedades físicas y mentales. En México, la medicina tradicional es de gran importancia tanto en el aspecto cultural como en el aspecto médico, ya que como en todos los pueblos del mundo, se han usado desde tiempos inmemoriales las plantas medicinales para tratar o prevenir enfermedades y una gran mayoría de la población sigue haciendo uso de ellas actualmente. La riqueza de la naturaleza en nuestro país y la necesidad de encontrar recursos accesibles para tratar diversos padecimientos han dado como resultado que en México, las plantas medicinales sean parte esencial de las estrategias generadas por la población para enfrentar las enfermedades cotidianas como los trastornos gastrointestinales, las infecciones respiratorias, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares, ya que constituyen el recurso material más amplio, accesible y valioso de la medicina indígena tradicional. Es importante destacar que dentro de la medicina tradicional, también se utilizan plantas empleadas como alimentos, por lo tanto, estas plantas presentan un beneficio adicional a su valor nutritivo al considerar sus propiedades medicinales en el tratamiento y prevención de varias enfermedades crónico-degenerativas, como lo son el cáncer, la hipertensión, la diabetes, entre otras.

El interés actual en la medicina herbolaria y en la búsqueda de opciones terapéuticas alternativas se debe principalmente a la creciente insatisfacción hacia la medicina convencional, tanto por su falta de éxito en la cura de algunas enfermedades, como por los efectos colaterales que ciertos medicamentos acarrear. De esta forma, es importante incorporar un sistema de medicina integral que combine las ventajas de la medicina moderna con la medicina tradicional, de tal manera que los tratamientos sean más eficientes y menos costosos para los pacientes.

En esta estrategia, los remedios tradicionales, y en particular los productos naturales originados a partir de especies vegetales, ocupan un lugar de primera importancia; no sólo porque constituyen el recurso más utilizado en el mundo, sino además porque representan la fuente primaria de principios activos que se usan, ya sea en su forma natural, ligeramente modificados, o como fuentes de inspiración para la síntesis de prototipos. Cabe señalar que los efectos farmacológicos de las plantas medicinales y alimenticias dependen evidentemente de la naturaleza de sus principios activos, los cuales pueden ejercer su efecto a través de un componente determinado o bien a través del conjunto de compuestos presentes en los extractos tradicionalmente consumidos en esa forma.

Por otra parte, a pesar de que muchos de los remedios tradicionales han demostrado su eficacia en la prevención o tratamiento de diversas enfermedades, otros han demostrado su fuerte toxicidad. Por lo tanto, las plantas que se consumen y se recomiendan por tradición deben ser estudiadas y probadas científicamente para que tengan una certificación tanto de sus perfiles químicos como de sus actividades farmacológicas, y de esta manera garantizar tanto su funcionalidad como su inocuidad o bien para que se empleen como una fuente potencial de nuevos fármacos.

Un criterio importante en el descubrimiento de principios activos consiste en identificar remedios tradicionales de uso reconocido por generaciones para el tratamiento de padecimientos determinados. En México, existe gran variedad de plantas y frutos que se consideran medicinales; sin embargo, sólo unas cuantas han sido estudiadas con el objeto de identificar o purificar los metabolitos secundarios que contienen y determinar sus propiedades farmacológicas.

En este sentido, el género *Crataegus*, además de ser ampliamente utilizado para el tratamiento de diversas enfermedades cardiovasculares en todo el mundo, es una de las especies vegetales empleadas en la medicina tradicional mexicana. En particular, la especie mexicana *Crataegus gracilior*, conocida comúnmente

como “tejocote”, al igual que otras especies mexicanas del mismo género, es consumida por la población mexicana. Sus frutos son empleados para la elaboración de una bebida tradicional conocida como “ponche”, así como dulces, y sus hojas se emplean para el tratamiento de enfermedades respiratorias. Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado investigaciones científicas orientadas hacia la determinación de algunos de sus compuestos químicos, ni hacia la determinación de sus efectos farmacológicos para considerarla como una candidata para el tratamiento de ciertas enfermedades.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Hipertensión arterial (HTA)**

La HTA está clasificada dentro de las llamadas enfermedades crónico-degenerativas, las cuales son adquiridas comúnmente por estilos de vida inapropiados, son de larga duración y por lo general de progresión lenta. Su importancia radica en que éstas, en sus diferentes manifestaciones, constituyen la principal causa de muerte en todo el mundo (Rosas *et al.*, 2008).

#### **2.1.1. Características y factores de riesgo de la HTA**

La HTA es el resultado del aumento del tono del músculo liso de los vasos periféricos que produce una mayor resistencia arteriolar y disminución de la capacitancia del sistema venoso. Se caracteriza por una elevación sostenida de la presión sistólica por arriba de 140 mm Hg y/o de la presión diastólica por arriba de 90 mm Hg (OMS, 2013).

Diversos estudios han identificado como factores que contribuyen a la aparición de HTA los siguientes: edad, alta ingesta de sodio, dietas elevadas en grasas saturadas, tabaquismo, estilo de vida sedentario y la presencia de enfermedades crónicas como obesidad, dislipidemias y diabetes, entre otros factores (PAHO, 2008; OMS, 2013).

#### **2.1.2. Datos estadísticos de la HTA**

La OMS señala que a nivel mundial, 1 de cada 3 adultos padece esta enfermedad. De ellos, 1 de cada 3 desconoce que está en tal situación y de aquellos que saben que tienen esta enfermedad, la tercera parte no logra disminuir sus valores de presión arterial a pesar de que se encuentran con algún tratamiento farmacológico (OMS, 2013).

La prevalencia de HTA en México se encuentra entre las más elevadas en el plano mundial. En tan solo seis años, entre 2000 y 2006, la prevalencia de HTA se incrementó 19.7% hasta afectar a 1 de cada 3 adultos mexicanos (31.6%). A pesar

de las medidas tomadas por diferentes instituciones de la salud, estas cifras no han disminuido sino que se han mantenido en ese porcentaje. Un dato alarmante es que del total de los adultos hipertensos, el 47.3% desconoce que padece dicha enfermedad y de los adultos con HTA diagnosticada, sólo 73.6% reciben tratamiento farmacológico y menos de la mitad de éstos tiene la enfermedad bajo control (ENSANUT, 2012).

### 2.1.3. Mecanismos innatos para la regulación de la HTA

Aunque la hipertensión puede ser secundaria a otras enfermedades, más del 90% de los casos representa una variedad conocida como hipertensión esencial, cuya causa se desconoce y afecta al mecanismo que regula la presión. La presión arterial (PA) está regulada dentro de un estrecho margen que le permite la adecuada perfusión de los tejidos sin causar daño al sistema vascular, en particular, a la capa íntima de las arterias. La PA está determinada por el producto entre el gasto cardíaco y la resistencia vascular periférica. El gasto cardíaco viene dado por la frecuencia cardíaca, la contractilidad y la presión de llenado; esta última es a su vez dependiente del volumen sanguíneo y del tono venoso. Por otra parte, la resistencia vascular está dada por el volumen arteriolar. Sea en personas sanas o hipertensas, el gasto cardíaco y la resistencia periférica se controlan sobre todo mediante dos mecanismos: los barorreceptores mediados por el sistema nervioso simpático y el sistema renina-angiotensina-aldosterona (Fig. 1) (Michel y Hoffman, 2012).

La respuesta mediada por el sistema nervioso simpático comprende el barorreflejo dependiente del sistema nervioso simpático, el cual se encarga de la respuesta reguladora rápida, momento a momento, de la PA. El aumento de la PA hace que las neuronas sensibles a la presión (barorreceptores situados en el cayado aórtico y el seno carotídeo) envíen impulsos a los centros cardiovasculares de la medula espinal. Esto desencadena una respuesta refleja de disminución del tono simpático y aumento de la actividad parasimpática en el corazón y los vasos sanguíneos, lo que tiene como resultado vasodilatación y disminución del gasto

cardiaco. Estos cambios generan una disminución compensatoria de la PA (Fig. 1) (Ganong, 2002; Michel y Hoffman, 2012).

Por otro lado, la respuesta mediada por el sistema renina-angiotensina-aldosterona comprende la función del riñón para el control a largo plazo de la PA al modificar el volumen sanguíneo. Los barorreceptores en los riñones reaccionan al aumento de la presión arterial (y a la inhibición de la estimulación simpática de los receptores adrenérgicos beta) al disminuir la liberación de la enzima renina. Esta peptidasa convierte el angiotensinógeno en angiotensina I, la cual después se transforma a angiotensina II en presencia de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La angiotensina II es el vasoconstrictor más potente en la circulación sanguínea y la inhibición de su síntesis provoca una disminución de la PA. Más aún, la angiotensina II estimula la secreción de aldosterona; la disminución de esta secreción lleva a una disminución de la reabsorción renal de sodio y de volumen sanguíneo, lo cual contribuye a la disminución de la presión arterial (Fig. 1) (Michel y Hoffman, 2012).

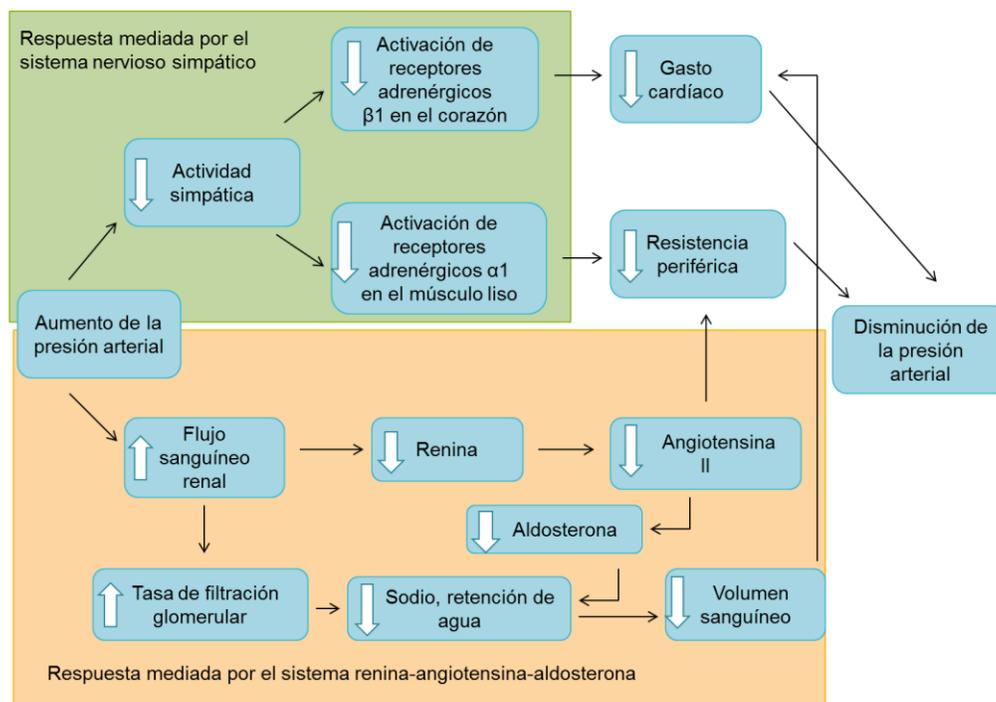


Figura 1. Mecanismos innatos para la regulación de la HTA (Michel y Hoffman, 2012).

#### 2.1.4. Tratamientos convencionales de la HTA

Cuando se tiene una disfunción de la respuesta del sistema nervioso autónomo y del sistema renina-angiotensina-aldosterona para disminuir la PA, se recurre a las seis clases principales de medicamentos utilizados para la reducción de la PA: diuréticos, bloqueadores de receptores adrenérgicos beta, inhibidores de la ECA, antagonistas de los receptores a angiotensina II, bloqueadores de canales de calcio y bloqueadores de receptores adrenérgicos-alfa (Rosas *et al.*, 2008).

- *Diuréticos*: disminuyen la PA mediante el aumento inicial de la excreción de sodio y agua. Esto hace que disminuya el volumen extracelular, lo que tiene como resultado una reducción del gasto cardíaco y del flujo sanguíneo renal. Ejemplos: bumetanida y furosemida.
- *Bloqueadores del receptor adrenérgico beta*: atenúan la presión arterial sobre todo por reducción del gasto cardíaco. También disminuyen la actividad simpática del sistema nervioso central e inhiben la liberación de renina por los riñones, con lo que aminora la formación de angiotensina II y la secreción de aldosterona. Ejemplos: propranolol y metoprolol.
- *Inhibidores de la ECA*: disminuyen la presión arterial al reducir la resistencia vascular periférica sin aumento reflejo del gasto cardíaco, frecuencia o contractilidad cardíacos. Estos fármacos suprimen la actividad de la ECA que transforma la angiotensina I hacia la variedad con mayor potencia vasoconstrictora, la angiotensina II. Estos inhibidores también disminuyen la velocidad de inactivación de la bradicinina. La vasodilatación es el resultado del efecto combinado de la disminución de la vasoconstricción por reducción del nivel de angiotensina II y el potente efecto vasodilatador del aumento de la bradicinina. Al decaer el nivel de angiotensina II en la circulación, los inhibidores de la ECA también atenúan la secreción de aldosterona, lo que produce una disminución de la retención de sodio y agua. Ejemplos: captopril y enalapril.
- *Antagonistas de los receptores de angiotensina II*: sus efectos farmacológicos son similares a los de los inhibidores de la ECA, ya que

producen vasodilatación y suprimen la secreción de aldosterona. Ejemplo: losartán.

- *Bloqueadores de los canales de calcio*: la concentración intracelular de calcio es importante para mantener el tono del músculo liso y la contractilidad del miocardio. El calcio entra a las células musculares a través de canales especiales sensibles al voltaje. Esto desencadena la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico y la mitocondria y con ello se incrementa el nivel citosólico de calcio. Los antagonistas del canal de calcio suprimen la entrada de calcio al unirse a los canales de tipo L en el corazón y el músculo liso de los vasos sanguíneos coronarios y periféricos. Esto ocasiona relajación del músculo liso y dilatación de las arterias. Ejemplos: nifedipina y verapamilo.
- *Bloqueadores de los receptores adrenérgicos alfa*: suprimen en forma competitiva a los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ , disminuyen la resistencia vascular periférica y la presión arterial al relajar el músculo liso arterial y venoso. Ejemplos: prazosina y terazosina.

Además, existe otro tipo de medicamentos utilizados para el tratamiento de la HTA, los cuales se conocen con el nombre de vasodilatadores periféricos. Este tipo de medicamentos relajan el músculo liso vascular, con lo que disminuye la resistencia periférica y por tanto la presión arterial. Algunos ejemplos son la hidralazina y el nitropusiato. Estos agentes producen estimulación refleja del corazón, que resulta un aumento de la contractilidad, taquicardia y consumo de oxígeno. Tales efectos pueden desencadenar angina de pecho, infarto del miocardio o insuficiencia cardíaca en personas con factores de riesgo. Los vasodilatadores también incrementan la concentración de renina plasmática, la cual induce un aumento de la retención de sodio y agua. Estos efectos indeseables pueden anularse con el uso combinado de un diurético y un bloqueador beta (Sánchez-García *et al*, 2008; Michel y Hoffman, 2012).

### 2.1.5. El sistema vascular y su importancia en la HTA

El sistema vascular tiene un papel importante en la regulación de la presión arterial. Este sistema está en contacto directo con la circulación sanguínea, y gracias a su composición anatómica es capaz de regular el tono vascular (Lahera *et al.*, 2003). Éste y otros mecanismos mencionados más adelante son las principales características por las cuales se considera al sistema vascular como un sistema importante en la regulación de la PA.

En general, el sistema vascular se divide en dos grandes grupos: la microvasculatura y la macrovasculatura. La primera comprende arteriolas, capilares y vénulas mientras que la segunda solo venas y arterias. Ambas tienen diferentes funciones, es decir, mientras que la macrovasculatura se encarga de transportar rápidamente la sangre desde el corazón hacia los tejidos y regresarla ya desoxigenada a través de las venas, la microvasculatura se encarga de llevar a cabo el paso de la sangre hacia los tejidos, el cual ocurre principalmente en los capilares (Yuan y Rigor, 2010).

Además, estos dos grupos son estructuralmente diferentes. La microvasculatura está compuesta principalmente por células endoteliales, a excepción de las arteriolas, las cuales tienen una anatomía muy similar a la de la macrovasculatura. Debido a la ausencia de músculo liso continuo, la microvasculatura carece de la función vasomotora. Sin embargo, ésta desempeña una gran función en cuanto a la permeabilidad vascular, ya que como se ha mencionado anteriormente, el endotelio vascular es el que está en contacto directo con la circulación sanguínea. Por otra parte, la macrovasculatura contiene además de la capa endotelial otras estructuras que le confieren su capacidad de modular, entre otras cosas, el tono vascular (Yuan y Rigor, 2010). En este sentido y para fines que interesan, solo se definirá la anatomía de las arterias.

Las paredes arteriales son espesas y compactas, lo que les permite resistir las altas presiones generadas dentro del sistema circulatorio. Están compuestas por cilindros concéntricos dispuestos uno dentro del otro, en los cuales existen componentes celulares y extracelulares. Tres son las capas que, dispuestas como cilindros, forman la estructura arterial y que se denominan, de la luz arterial hacia la periferia, como íntima arterial, capa media o músculo-elástica y por último capa externa o adventicia (Fig. 2) (Ganong, 2002).

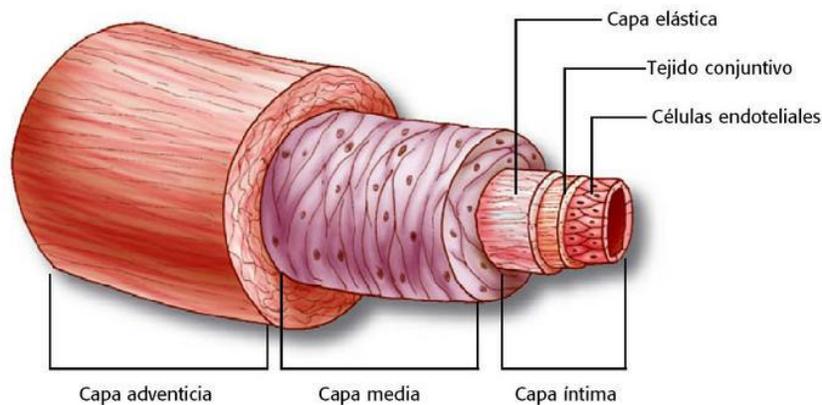


Figura 2. Anatomía de la arteria vascular (Lahera *et al.*, 2010).

#### 2.1.5.1. Función del endotelio vascular

El endotelio vascular es considerado como un órgano estructural y funcionalmente complejo; está compuesto de una monocapa de células endoteliales que se alinean en todo el sistema circulatorio. El endotelio participa de manera importante en la regulación local del flujo sanguíneo y del calibre de los vasos sanguíneos (Badimón y Martínez-González, 2002).

Las células endoteliales del sistema vascular producen sustancias endógenas como la prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), el óxido nítrico (NO) y el sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ), las cuales proporcionan estímulos vasodilatadores tónicos bajo condiciones fisiológicas *in vivo*. Sin embargo, estas células endoteliales también producen de forma regulada potentes sustancias vasoconstrictoras como la endotelina-1, el tromboxano ( $\text{TXA}_2$ )

y la prostaglandina (PGE<sub>2</sub>) (Badimón y Martínez-González, 2002 y Lahera *et al.*, 2003).

Las alteraciones en la producción de NO o su catabolismo excesivo afectan la función vasomotora dependiente del endotelio del sistema vascular y contribuyen a un aumento de la vasoconstricción en diferentes estados patológicos. La producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO), como el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), por las células endoteliales o del músculo liso ocasiona una reducción en la biodisponibilidad del NO. Todos esos factores desencadenan lo que se conoce como disfunción endotelial (Lahera *et al.*, 2003).

#### 2.1.5.2. Función del músculo liso vascular

Las células del músculo liso vascular también contribuyen de manera activa a la fisiopatología vascular. La contracción y relajación de las células del músculo liso a nivel de las arterias musculares controlan la presión arterial y, por consiguiente, el flujo sanguíneo regional. Las células del músculo liso vascular determinan el tono de los vasos sanguíneos. Estas células se contraen cuando son estimuladas por un aumento en la concentración intracelular de calcio por la entrada de éste a través de la membrana plasmática y por la liberación del mismo de las reservas intracelulares (Guyton y Hall, 2001). En las células vasculares del músculo liso, los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje se abren con la despolarización de la membrana, la cual es regulada por bombas de iones dependientes de energía como la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa y por canales iónicos de K<sup>+</sup> sensible a Ca<sup>2+</sup>. Los cambios locales en la concentración intracelular de calcio, denominados “destellos de calcio”, son resultado de la entrada de este ion a través del canal de calcio dependiente de voltaje y son causados por la activación coordinada de un conglomerado de conductos de liberación de calcio sensible a la rianodina, los cuales se encuentran en el retículo sarcoplásmico (Fig. 3) (Loscalzo *et al.*, 2004).

Los agonistas bioquímicos también incrementan la concentración intracelular de calcio mediante la activación de receptores acoplados a proteínas G<sub>q</sub>, las

cuales activan a la fosfolipasa C (PLC) que provoca hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP<sub>2</sub>) y como consecuencia generación de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). Tales derivados de lípidos de membrana activan, a su vez, a la proteína cinasa C (PKC) e incrementan la concentración intracelular de calcio. Además, el IP<sub>3</sub> se une a su receptor específico que se encuentra en la membrana del retículo sarcoplásmico e incrementa la salida de calcio de esta reserva de calcio hacia el citoplasma (Fig. 3) (Loscalzo *et al.*, 2004)

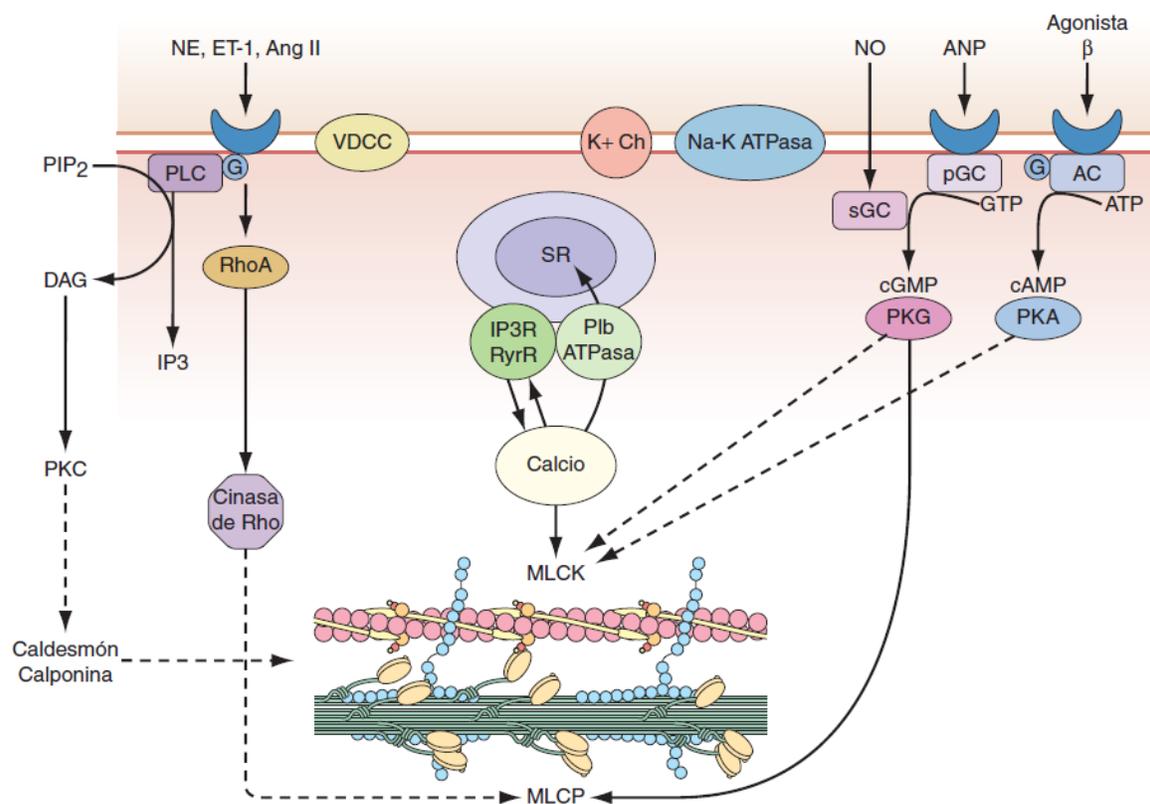


Figura 3. Regulación de la concentración de calcio en la célula de músculo liso vascular y contracción dependiente de la ATPasa de la actomiosina (Loscalzo *et al.*, 2004).

La contracción de la célula del músculo liso vascular es controlada principalmente por la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC), la cual en el estado de equilibrio, depende del equilibrio entre las acciones de la cinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) y la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP). El calcio activa a la MLCK a través de la formación de un complejo calcio-

calmodulina ( $\text{Ca}^{2+}$ -CaM). La fosforilación de la MLC por acción de esta cinasa aumenta la actividad de ATP-asa de la miosina e intensifica la contracción. La MLCP desfosforila a la MLC, disminuyendo la actividad de la ATPasa de miosina y la fuerza contráctil (Guyton y Hall, 2001). La fosforilación de la subunidad fijadora de miosina de la MLCP por la cinasa Rho inhibe la actividad de la fosfatasa y desencadena la sensibilización al calcio del aparato contráctil. La cinasa Rho es activada por la GTPasa pequeña Rho, que es estimulada por factores de intercambio de guanosina e inhibida por las proteínas que activan a la GTPasa (Fig. 3) (Khalil, 2010).

Tanto el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) como el monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) relajan las células del músculo liso vascular mediante mecanismos complejos. Los agonistas  $\beta$  que actúan a través de sus receptores acoplados a proteína G activan a la adenilato ciclasa (AG) para convertir trifosfato de adenosina (ATP) en AMPc. El óxido nítrico y el péptido natriurético auricular, mediante una acción directa y a través de un receptor acoplado a la proteína G, respectivamente, activan a la guanilato ciclasa (GC) para convertir trifosfato de guanosina (GTP) en GMPc. Estos agonistas de los receptores, a su vez, activan a la proteína cinasa A (PKA) y a la proteína cinasa G (PKG), respectivamente, las cuales inactiva a la MLCK y disminuye el tono del músculo liso vascular. Además, la PKG interacciona de manera directa con el sustrato fijador de miosina, la subunidad de MLCP, aumentando la actividad de la fosfatasa y disminuyendo el tono vascular (Fig. 3) (Heller *et al.*, 2003).

#### 2.1.5.3. Control del tono de la célula del músculo liso vascular

El tono de la célula del músculo liso vascular está controlado por el sistema nervioso autónomo y por el endotelio en mecanismos de control muy exactos. Las neuronas autónomas entran en la capa media de los vasos sanguíneos desde la adventicia y modulan el tono de las células del músculo liso vascular en respuesta a barorreceptores y quimiorreceptores dentro del arco aórtico y los cuerpos carotídeos y en respuesta a los termorreceptores presentes en la piel. Tales

componentes reguladores comprenden los arcos reflejos de acción rápida modulados por los impulsos centrales que responden a los impulsos sensoriales (olfativos, visuales, auditivos y táctiles) lo mismo que a estímulos emocionales. La regulación autónoma del tono vascular está mediada por tres clases de nervios: simpáticos, cuyos principales neurotransmisores son adrenalina y noradrenalina; parasimpáticos, cuyo principal neurotransmisor es la acetilcolina (ACh); y no adrenérgicos/no colinérgicos, que incluyen dos subgrupos, nitrérgicos, cuyo principal neurotransmisor es el óxido nítrico; y peptidérgicos, cuyos principales neurotransmisores son la sustancia P, el péptido intestinal vasoactivo, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina y ATP (Loscalzo *et al.*, 2004).

Cada uno de estos neurotransmisores se considera que tienen un receptor específico en la célula del músculo liso vascular para modular el calcio intracelular y, en consecuencia, el tono contráctil. La noradrenalina activa a los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos y la adrenalina activa a los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicos en la mayor parte de los vasos sanguíneos. La noradrenalina activa a los receptores  $\alpha_1$  que se encuentran distales en las arterias grandes y los receptores  $\alpha_2$  en las arterias pequeñas y las arteriolas, lo que desencadena vasoconstricción. La mayor parte de los vasos sanguíneos expresan receptores adrenérgicos  $\beta_2$  en sus células del músculo liso vascular y responden a los agonistas  $\beta$  mediante la relajación dependiente de AMP cíclico. La ACh, liberada por las neuronas parasimpáticas, se une a los receptores muscarínicos en las células del músculo liso vascular para producir relajación de los vasos. Además, el NO estimula las neuronas presinápticas para liberar ACh, la cual puede estimular la liberación de óxido nítrico por el endotelio. Las neuronas nitrérgicas liberan NO producido por la sintetasa neuronal de NO, lo cual ocasiona relajación de la célula del músculo liso vascular a través de los mecanismos dependientes e independientes del GMPc antes descritos. Todos los neurotransmisores peptidérgicos producen vasodilatación potente, actuando en forma directa o mediante la liberación de óxido nítrico dependiente de endotelio para reducir el tono de la célula del músculo liso vascular (Loscalzo *et al.*, 2004).

## 2.2. Compuestos vasodilatadores derivados de plantas

Además de los medicamentos convencionales para tratar la HTA mencionados en el punto 2.1.4, existe otra fuente importante para el tratamiento de la HTA que son los productos naturales. Se ha reportado que diversos metabolitos secundarios obtenidos de plantas poseen efectos vasodilatadores mediante diversos mecanismos de acción tales como activación de la vía del NO/GMPc, activación de la vía PGI<sub>2</sub>/AMPc, inhibición de PDE, inhibición de PKC, activación de canales de K<sup>+</sup> y bloqueo de canales de Ca<sup>2+</sup>. De estos mecanismos, la vía del NO/GMPc es el más frecuentemente utilizado por los compuestos vasodilatadores derivados de las plantas (Luna-Vázquez *et al.*, 2013). Para fines prácticos, solo se describirá el mecanismo de acción mediado por esta vía.

### 2.2.1. Vasodilatación mediada por la activación de la vía del NO/GMPc

Como se ha mencionado, el NO es uno de los compuestos bioactivos liberados por el endotelio vascular, el cual es producido por la enzima sintetasa de NO endotelial (eNOS). Esta enzima cataliza la oxidación del grupo guanidina de la L-arginina en presencia de oxígeno molecular y de varios cofactores, resultando en una producción estequiométrica de NO y L-citrulina. El NO es un gas altamente lipofílico y difusible, penetra la membrana celular alcanzando sus dianas biológicas aún fuera del lugar donde es producido (Schmitt y Dirsch, 2009).

La activación de la vía del NO-GMPc es iniciada por la estimulación de receptores muscarínicos acoplados a proteínas G<sub>q</sub> de la célula endotelial. Algunos de los ligandos que pueden activar a estos receptores son la acetilcolina (ACh), la 5-hidroxitriptamina (5-HT<sub>2C</sub>) o la histamina (His). La estimulación de estos receptores activa a la PLC, la cual produce DAG e IP<sub>3</sub>. Este último induce la liberación de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico al citoplasma de la célula endotelial. El Ca<sup>2+</sup> activa a la calmodulina (CaM) y este complejo Ca<sup>2+</sup>-CaM activa a la eNOS. Sin embargo, la activación de eNOS no solo depende del complejo Ca<sup>2+</sup>-CaM;

otros factores como la fosforilación en residuos serina (Ser), treonina (Thr) y tirosina (Tyr), también contribuyen a su activación (Chatterjee y Catravas, 2008).

Una vez producido en las células endoteliales, el NO se difunde a las células del músculo liso vascular donde estimula a la guanilato ciclasa soluble (GCs), la cual produce GMPc a partir de GTP; éste a su vez provoca la activación de la PKG. Esta última, como se mencionó anteriormente, inactiva a la MLCK y es capaz de activar a la MLCP, dando como resultado la disminución del tono de la célula del músculo liso vascular. Además, la PKG fosforila canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ , causando de esta forma una hiperpolarización, pero fosforila además al receptor del  $IP_3$ , inhibiendo así la salida de calcio del retículo endoplásmico, causando de esta forma la relajación muscular (Fig. 4) (Oelze *et al.*, 2000).

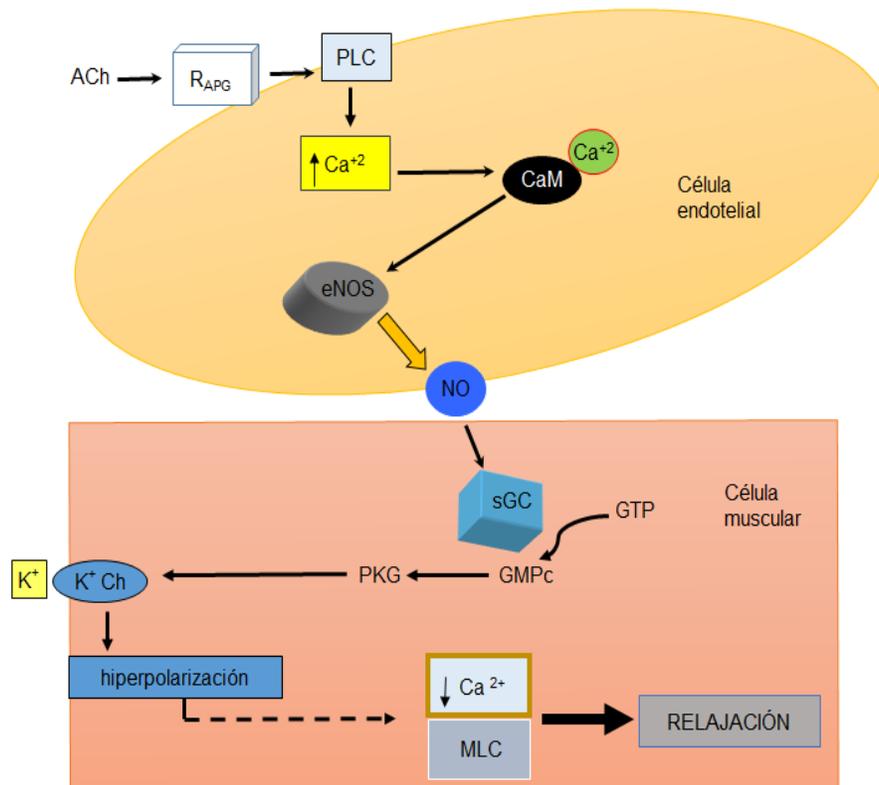


Figura 4. Mecanismo de relajación mediado por la vía del NO-GMPc (Luna-Vázquez, 2014).

## 2.3. El género *Crataegus*

### 2.3.1. Historia y usos tradicionales de *Crataegus* spp.

El género *Crataegus* tiene una larga historia de uso etnomédico. Se tienen datos donde se sostiene que este género era ya utilizado en la medicina tradicional de Europa desde el primer siglo d.C. Además, su uso en la medicina herbolaria de China data desde el año 659 d.C, donde fue mencionado por primera vez en la primera farmacopea oficial del mundo (Chang *et al.*, 2002). En relación con su uso para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el sistema cardiovascular, éste comenzó a finales de 1800 (Rigelsky y Sweet, 2002). Actualmente, más de 20 especies del género *Crataegus* son utilizadas en la medicina herbolaria de muchos países europeos y asiáticos (Chang *et al.*, 2002). En China, la especie más utilizada es *Crataegus pinnatifida*, mientras que en Europa, en países como Alemania, Francia e Inglaterra, las especies más utilizadas son *C. oxyacantha*, *C. monogyna*, *C. nigra* y *C. pentagyna* (Yang y Liu, 2012).

En la medicina tradicional china, los frutos de este género se han utilizado para estimular la digestión y mejorar la función del estómago, mejorar la circulación sanguínea, tratar la diarrea, dolores abdominales y la amenorrea, así como para el tratamiento de la hipertensión arterial y la hiperlipidemia (Chinese Pharmacopoeia, 2005). En Europa, los frutos, flores y hojas de este género han sido utilizados tradicionalmente por su efecto astringente, antiespasmódico, cardiotónico, diurético, hipotensivo y antiesclerótico (Chang *et al.*, 2002). En el norte de América, *Crataegus* spp. se ha utilizado para los mismos propósitos medicinales (Wang *et al.*, 2013). Particularmente en México, las infusiones, obtenidas a partir de los frutos de algunas especies de *Crataegus*, han sido utilizadas como un remedio tradicional para prevenir enfermedades respiratorias tales como tos, gripa, bronquitis y asma (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2013).

Además, los frutos de *Crataegus* se han utilizado tanto en China como en Europa, no solo como parte de la medicina tradicional, sino también por los usos alimenticios que se le han dado en productos como bebidas, jaleas y mermeladas (Yang y Liu, 2012). En México, los frutos se reportan como comestibles y se utilizan de igual forma para la elaboración de jaleas, dulces y conservas. Además, estos son muy apreciados en la elaboración de ponche, una bebida de la cultura tradicional mexicana, siendo *C. mexicana* Moc. & Sessé, *Crataegus gracilior* Phipps y *Crataegus greggiana* Eggl las especies más utilizadas (Núñez-Colín y Hernández-Martínez, 2011).

### 2.3.2 Distribución geográfica

El género *Crataegus* pertenece a la familia Rosaceae y está constituido por 280 especies aproximadamente, las cuales se distribuyen alrededor de todo el mundo. La distribución principal de sus especies comprende el 25% para Europa y el este de Asia y el 75% para Norteamérica (Hobbs y Foster, 1990).

En México, el género *Crataegus* está integrado por quince especies, de las cuales 10 son endémicas (Núñez-Colín *et al.*, 2008). El nombre más común con el que se le conoce es “tejocote”, vocablo derivado del Náhuatl “te-xocotl” que significa fruta dura (Cabrera, 1992). Su distribución comprende todo el país (Fig. 5). Sin embargo, *C. gracilior* se encuentra principalmente distribuida en el centro y suroeste del país (Phipps, 1997).



Figura 5. Distribución geográfica del género *Crataegus* en México (Núñez-Colín et al., 2008).

*Crataegus gracilior* es una especie endémica del noreste y este de México (Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Puebla y Veracruz). En Querétaro, esta planta, también conocida como “tejocote sin espinas”, se encuentra ubicada en la porción norte y centro del estado, donde muchas veces resulta difícil su distinción de *C. mexicana* (Fig. 6) (Rzedowski y Calderon-de-Rzedowski, 2005).

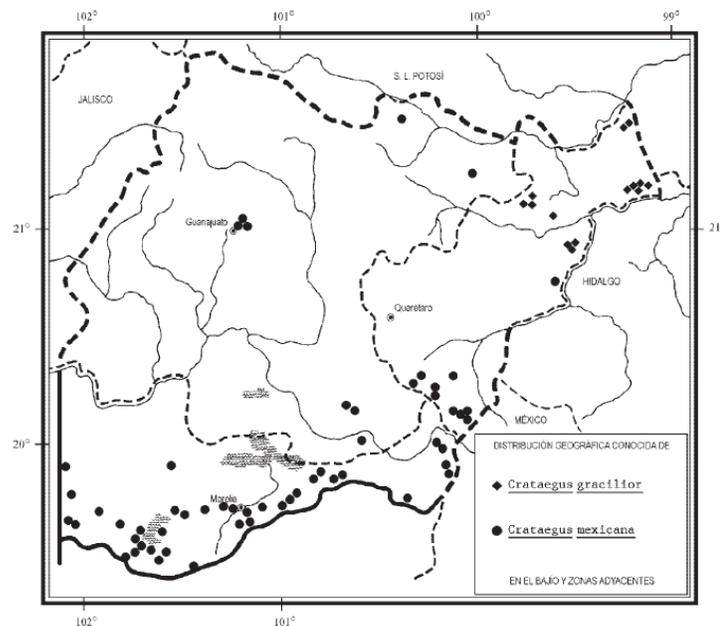


Figura 6. Distribución geográfica de *C. gracilior* y *C mexicana* en el bajío y zonas adyacentes (Núñez-Colín *et al.*, 2008).

### 2.3.3. Descripción botánica breve

Las especies del género *Crataegus* se describen botánicamente como arbustos o árboles pequeños, por lo común provistos de espinas, ramillas abreviadas (braquiblastos); sus frutos están en forma de pomo globoso a elipsoide o piriforme, de color amarillo a rojo o negro en la madurez, con el cáliz persistente en el ápice o caduco, conteniendo de 1 a 5 núculas de consistencia ósea, cada una con 1 o 2 semillas (Rzedowski y Calderon-de-Rzedowski, 2005).

*C. gracilior* en particular es un árbol (o a veces arbusto) de hasta de 10 m de alto, pero por lo general de talla mucho menor, caducifolio, provisto de espinas rectas, delgadas pero fuertes, hasta de 1.5 a 2.5 cm de largo, en ocasiones parcial o totalmente desprovisto de las mismas; tiene ramillas tiernas, con frecuencia café-rojizas o verdosas, vilosas, las más maduras grisáceas y glabrescentes. El fruto es amarillo claro, más o menos globoso o con frecuencia tendiendo a oblato, de 1.5 a 2.5 cm de diámetro, en ocasiones ligeramente pubescente. La planta se encuentra por lo común en forma abundante en la vegetación secundaria derivada del bosque mesófilo de montaña, de encino y de pino-encino en la zona norte y centro de Querétaro, a una altitud de 1100-2400 m. Se ha colectado en flor entre marzo y mayo, en fruto entre septiembre y noviembre (Rzedowski y Calderon-de-Rzedowski, 2005).

### 2.3.4. Metabolitos secundarios identificados en *Crataegus* spp.

Los principales metabolitos secundarios reportados para las especies del género *Crataegus* son compuestos fenólicos. Sin embargo, en pocas ocasiones se han identificado también terpenoides, en particular triterpenos.

Los metabolitos secundarios se distribuyen en todas las partes de las plantas, es decir que se pueden encontrar tanto en hojas como en frutos, flores, tallos y raíces. De hecho, las diferencias en el contenido de estos compuestos

justifican de alguna forma el uso etnomédico que se le da a ciertas partes de las plantas. El género *Crataegus* no es la excepción, ya que se ha observado que sus metabolitos secundarios se encuentran en diferentes concentraciones en las diferentes partes de las plantas.

#### 2.3.4.1. Compuestos fenólicos identificados en *Crataegus* spp.

Se ha observado en numerosos estudios la abundancia de compuestos fenólicos de este género. Por ejemplo, un estudio publicado por Chang *et al.* (2012) comparó el contenido de compuestos fenólicos y de terpenoides presentes en el extracto metanólico obtenido a partir de los frutos secos de *C. pinnatifida* con otras cuatro especies de plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional china por sus propiedades antioxidantes. Los resultados mostraron que *C. pinnatifida* tuvo un contenido significativamente mayor de compuestos fenólicos ( $599.0 \pm 16.0$  mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto) que los demás extractos, mientras que su contenido de triterpenos fue significativamente menor ( $1.7 \pm 0.2$  mg de ácido ursólico/g de extracto) que el de los otros extractos (Chang *et al.*, 2012).

El contenido de compuestos fenólicos muchas veces depende de las condiciones de estrés a las cuales esté sometida la planta. En este sentido, un trabajo realizado por Kirakosyan *et al.* (2003) comparó el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de *C. laevigata* y *C. monogyna*, ambas especies sometidas tanto a condiciones de estrés como a condiciones normales. Las condiciones de estrés a las que se sometieron las plantas fueron la restricción de agua por 10 días y el sometimiento a bajas temperaturas (4°C). Los resultados mostraron que el sometimiento a bajas temperaturas provoca un incremento del contenido de algunos compuestos fenólicos tales como los flavonoides (-) epicatequina, 2"-O-ramnósido de acetilvitexina, 2"-O-ramnósido de vitexina e hiperósido. Mientras que, comparado con el grupo control, la restricción de agua disminuye de manera significativa el contenido de dichos compuestos. La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó mediante la

cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector de arreglo de diodos (PDA o DAD: de sus siglas en inglés, PhotoDiode Array Detector) y el empleo de los correspondientes estándares. Del mismo modo, la actividad antioxidante, medida mediante un ensayo modificado de ABTS, se vio potenciada en las plantas que fueron sometidas a estrés tanto por restricción de agua como por disminución de la temperatura. Esto demuestra que diferentes condiciones de estrés pueden mejorar los niveles de metabolitos secundarios importantes, así como las capacidades antioxidantes de estas dos especies vegetales (Kirakosyan *et al.*, 2003).

El contenido de compuestos fenólicos también se ve afectado por el grado de madurez de una planta. Por ello, es importante hacer la comparación del contenido de tales compuestos respecto al grado de madurez. En una especie de *Crataegus grayana* de origen norteamericano, se hizo la comparación del contenido de compuestos fenólicos en frutos y hojas en diferente estado de madurez (agosto y septiembre). Se encontró en esta especie una gran diversidad de compuestos fenólicos, entre los cuales se identificaron la epicatequina, las procianidinas B2, B5 y C1 (Fig. 7), el hiperósido, un pentósido de quercetina y flavonas C-glicosiladas. La mayor concentración de estos compuestos se encontró en las hojas de esta especie. Otros compuestos como la ideaina y el ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido clorogénico) fueron encontrados únicamente en los frutos. La identificación de los compuestos se hizo nuevamente mediante HPLC acoplado a un detector de arreglo de diodos y a un espectrómetro de masas mientras que la cuantificación se hizo mediante curvas de calibración con los estándares correspondientes. En general, se encontró que para las hojas, se tiene una mayor concentración de compuestos fenólicos cuanto mayor es el grado de madurez, mientras que para los frutos, la mayor concentración de compuestos fenólicos se encuentra en un grado de madurez menor (Liu *et al.*, 2011).

Los flavonoides constituyen los compuestos fenólicos más estudiados del género *Crataegus*, siendo las procianidinas oligoméricas las de mayor interés,

debido a que los efectos farmacológicos de esas especies vegetales se han atribuido principalmente a esos metabolitos secundarios. Sin embargo, existen también estudios químicos que abordaron los fenoles simples. Por ejemplo, Öztürk y Tunçel (2011) reportaron las diferencias del contenido de ácidos fenólicos en diferentes partes de *C. monogyna*, determinadas mediante HPLC, así como la diferencia en el contenido de fenoles totales. Además, compararon las diferencias que existían en los perfiles de fenólicos en función de los métodos de extracción. Los resultados indicaron que los extractos obtenidos de las hojas junto con las flores presentaron un mayor contenido de ácidos fenólicos que los extractos obtenidos de la piel y de las semillas de los frutos. En relación con los métodos de extracción usados (maceración con metanol, con acetato de etilo, con agua en infusión), no se encontró una correlación general entre éstos y el contenido de ácidos fenólicos, es decir que para ciertos compuestos fue conveniente utilizar un tipo de método y para otros fue conveniente utilizar otro. En cuanto al contenido de fenoles totales, se observó un mayor rendimiento de estos compuestos en los extractos obtenidos a partir de las flores y las hojas comparado con los extractos obtenidos a partir de las semillas y de la piel de los frutos. Además, en el contenido de compuestos fenólicos totales sí se observó una diferencia significativa entre los métodos de extracción utilizados, ya que la maceración con acetato de etilo fue el método que presentó un mayor rendimiento de fenoles totales, mientras que la maceración acuosa tuvo el menor rendimiento. Esta misma tendencia se observó en los resultados obtenidos para la actividad antioxidante (Öztürk y Tunçel, 2011).

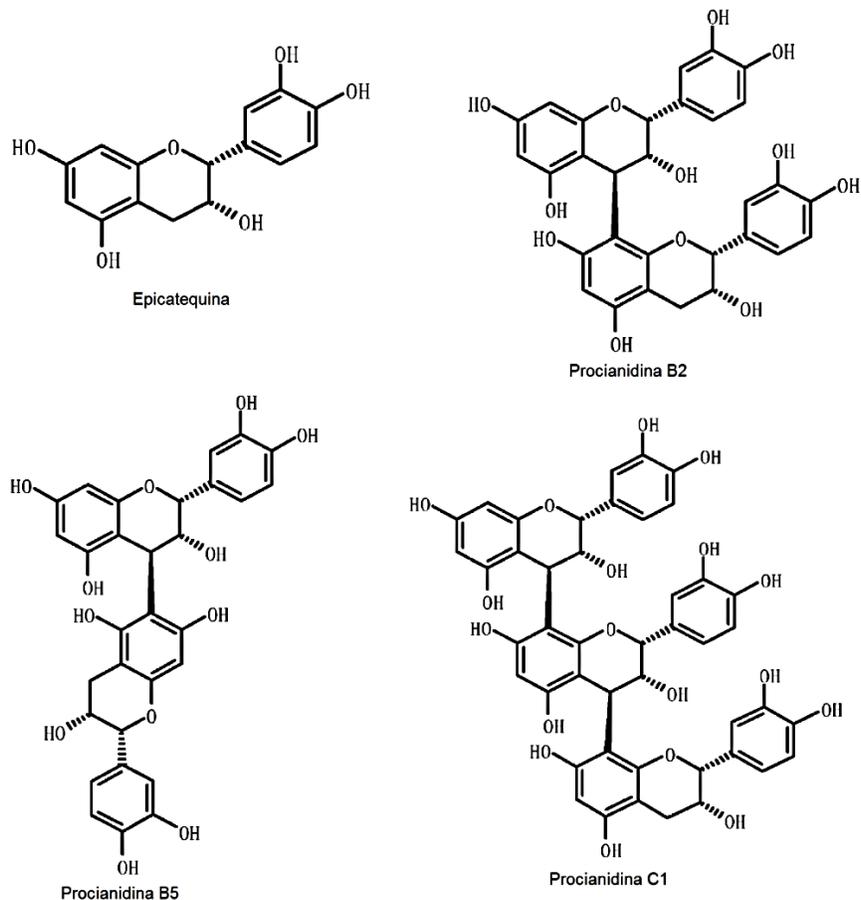


Figura 7. Procianidinas identificadas en *C. grayana*.

Como ya se ha mencionado, los compuestos fenólicos bioactivos más importantes presentes en el género *Crataegus* son las procianidinas oligoméricas. De hecho, el extracto WS1442® se basa en el contenido de este tipo de compuestos para su estandarización. Las procianidinas oligoméricas son una clase de proantocianidinas (taninos condensados) que consisten de unidades básicas de 3-flavanol (epicatequina y/o catequina) (ver Fig. 7). Las procianidinas pueden ser clasificadas como oligoméricas, si las unidades condensadas van de 2 a 6, o poliméricas si la condensación ocurre entre más de 6 unidades. La inestabilidad y la diversidad de las procianidinas, así como su poca solubilidad, complican su aislamiento como compuestos individuales. Sin embargo, algunas procianidinas han sido aisladas de las hojas y flores de *C. laevigata* mediante cromatografía líquida en columna abierta. Las procianidinas aisladas fueron identificadas como

epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina (procianidina B2), catequina-(4 $\alpha$ →8)-epicatequina (procianidina B4), epicatequina-(4 $\beta$ →6)-epicatequina (procianidina B5), epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina (procianidina C1), epicatequina-(4 $\beta$ →6)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina y epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina (procianidina D-1) (Fig. 7). La elucidación de las estructuras se hizo mediante el análisis de sus espectros UV y MS (Svedström *et al.*, 2002).

En cuanto a especies mexicanas de *Crataegus*, únicamente se tiene un trabajo publicado por García-Mateos *et al.* (2013), en el cual se identificaron, mediante HPLC acoplada e Espectrometría de Masas (HPLC-MS), cuatro flavonoides glicosilados en las flores de tres especies mexicanas: *C. stipulosa*, *C. mexicana* y *C. nelsoni*. Los compuestos identificados fueron los siguientes glicósidos de quercetina: 3-O-glucósido de quercetina, 3-O-ramnósido de quercetina, 3-O-ramnosil-(1→6)-glucósido de quercetina y 3-O-ramnosil-(1→2)-ramnosil-(1→6)-glucósido de quercetina (García-Mateos *et al.*, 2013).

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha determinado, mediante el sistema HPLC-DAD, el perfil de compuestos fenólicos en las hojas y frutos de dos especies mexicanas: *C. mexicana* y *C. gracilior*. Los resultados obtenidos demostraron la presencia de rutina, quercetina, kaempferol y (+)-catequina en ambas especies, siendo la (+)-catequina el compuesto que se encuentra en mayor abundancia. Además, en *C. gracilior* se identificó la presencia de ácido clorogénico (Hernández-Pérez, 2012; López-Corona, 2013).

También se ha determinado en *C. mexicana* el contenido de fenoles totales y flavonoides de los diferentes extractos obtenidos a partir de frutos y hojas. Los datos obtenidos muestran que el extracto metanólico obtenido de las hojas posee una mayor cantidad de compuestos fenólicos totales y de flavonoides. Lo anterior fue congruente con la actividad antioxidante que presentó el extracto metanólico, la cual fue mayor a la de los demás extractos (Hernández-Pérez, 2012).

#### 2.3.4.2. Terpenoides

Además de compuestos fenólicos, también se han identificado terpenoides en algunas especies del género *Crataegus*. Los ácidos oleanólico, ursólico, euscápico y corosólico han sido identificados en *C. pinnatifida* y en *C. scabrifolia*, mientras que otros terpenos del tipo linarionósidos A y B han sido identificados solo en *C. pinnatifida* (Edwards *et al.*, 2012).

Los terpenoides o terpenos comprenden un amplio número de productos naturales con una gran variedad de actividades biológicas. Éstos son quizá los metabolitos secundarios de mayor variabilidad estructural, contabilizándose hace unos quince años cerca de 25,000 (Croteau *et al.*, 2000). Debido a la identificación de algunos terpenoides en este trabajo, consideraremos aspectos relevantes de esos metabolitos secundarios.

Todos los terpenoides son derivados de unidades de cinco carbonos basados sobre el esqueleto isopentano. Estos monómeros generalmente son referidos como unidades de isopreno debido a la descomposición termal de muchos terpenoides, la cual da lugar al alqueno isopreno como producto. Por estas razones, los terpenoides son llamados frecuentemente isoprenoides (Croteau *et al.*, 2000).

Las unidades de cinco carbonos (isopreno) que forman los terpenoides son a menudo unidas en forma de cabeza-cola; sin embargo, las uniones cabeza-cabeza son también comunes y algunos productos son formados por fusión de la cabeza y un carbono situado entre los extremos del isopreno (Fig. 8) (Croteau *et al.*, 2000).

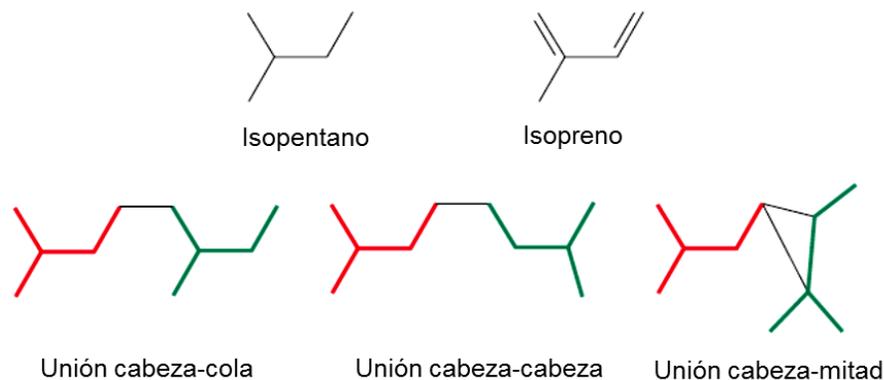


Figura 8. Estructuras básicas de las unidades biosintéticas de terpenos y del tipo de unión de las mismas (Croteau *et al.*, 2000).

#### 2.3.4.2.1. Clasificación de los terpenoides

Los terpenoides son clasificados por el número de unidades de cinco carbonos que contengan en su estructura. Los terpenos más pequeños contienen una única unidad de isopreno, de tal modo que ellos son nombrados como hemiterpenos. El más conocido de los hemiterpenos es el isopreno mismo, un producto volátil (Croteau *et al.*, 2000). Los siguientes terpenos en la serie comprenden los monoterpenos ( $C_{10}$ ), los sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), los diterpenos ( $C_{20}$ ), los sesterterpenos ( $C_{25}$  muy escasos en la naturaleza), los triterpenos ( $C_{30}$ ), los tetraterpenos ( $C_{40}$ ) y los terpenoides superiores ( $C > 40$ ) (Fig. 9) (Dewick, 2002).

#### 2.3.4.2.2. Biosíntesis de terpenoides

La biosíntesis de todos los terpenoides puede ser dividida en cuatro pasos:

- 1) Síntesis del precursor fundamental IPP.
- 2) Adiciones repetitivas de IPP para formar una serie de homólogos prenil difosfato que sirven como precursores intermediarios de las diferentes clases de terpenoides.
- 3) Elaboración de aquellos difosfatos prenil alílicos mediante sintasas de terpenoides específicas para generar esqueletos de terpenoides.

4) Modificaciones enzimáticas secundarias de los esqueletos para dar lugar a propiedades funcionales y a una gran diversidad química de esta familia de productos naturales (Croteau *et al.*, 2000).

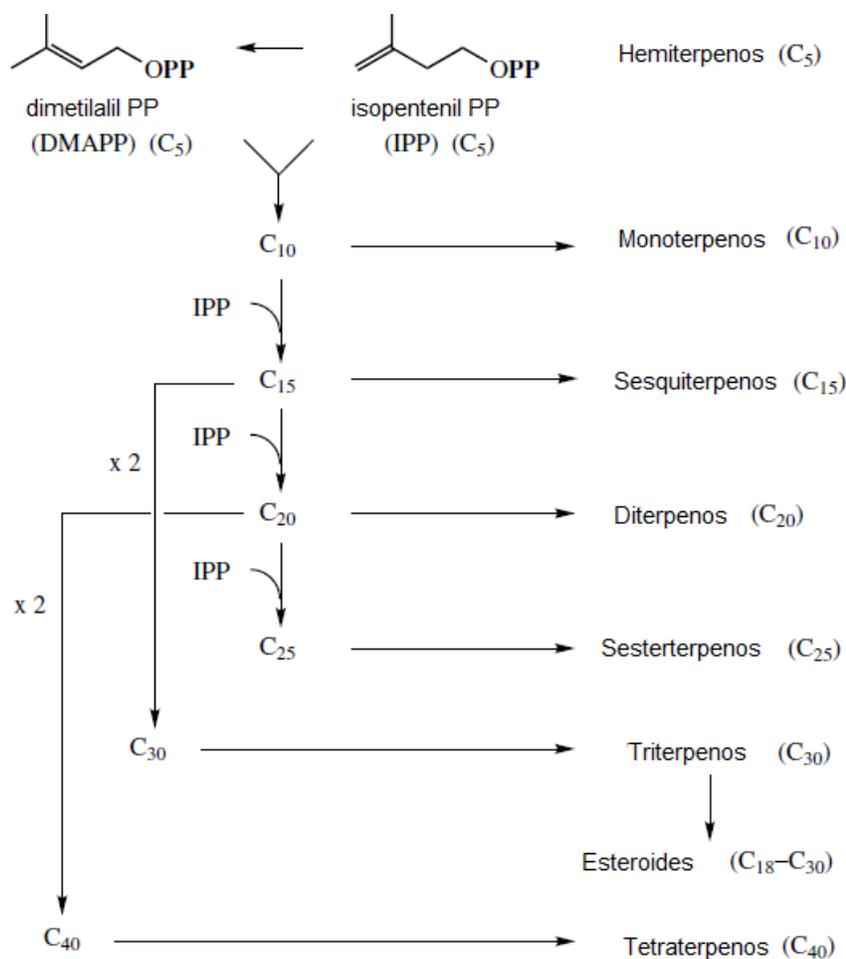


Figura 9. Clasificación de los terpenoides (Dewick, 2002).

#### 2.3.4.2.3. Biosíntesis de triterpenos

Los triterpenos son generados por la unión cabeza-cabeza de dos unidades de farnesil-PP, cada una de las cuales está integrada por tres unidades (una de dimetilalilpirofosfato y dos unidades de isopentenil pirofosfato). Dicha unión da lugar al escualeno (Babalola y Shode, 2013), el cual posteriormente es sometido a una serie de reacciones de ciclización. Dicho proceso ocurre a través del intermediario 2,3-óxido de escualeno (Fig.10). Si el óxido de escualeno está dispuesto y plegado de manera adecuada sobre la superficie de la enzima, las estructuras de triterpenos policíclicos pueden ser formadas en términos de una

serie de ciclizaciones, seguido de una secuencia de migraciones de Wagner-Meerwein de metilos e hidruros. La Figura 10 ilustra los pasos involucrados en la generación de tres ácidos triterpénicos, el corosólico, el oleanólico y el ursólico (Dewick, 2002).

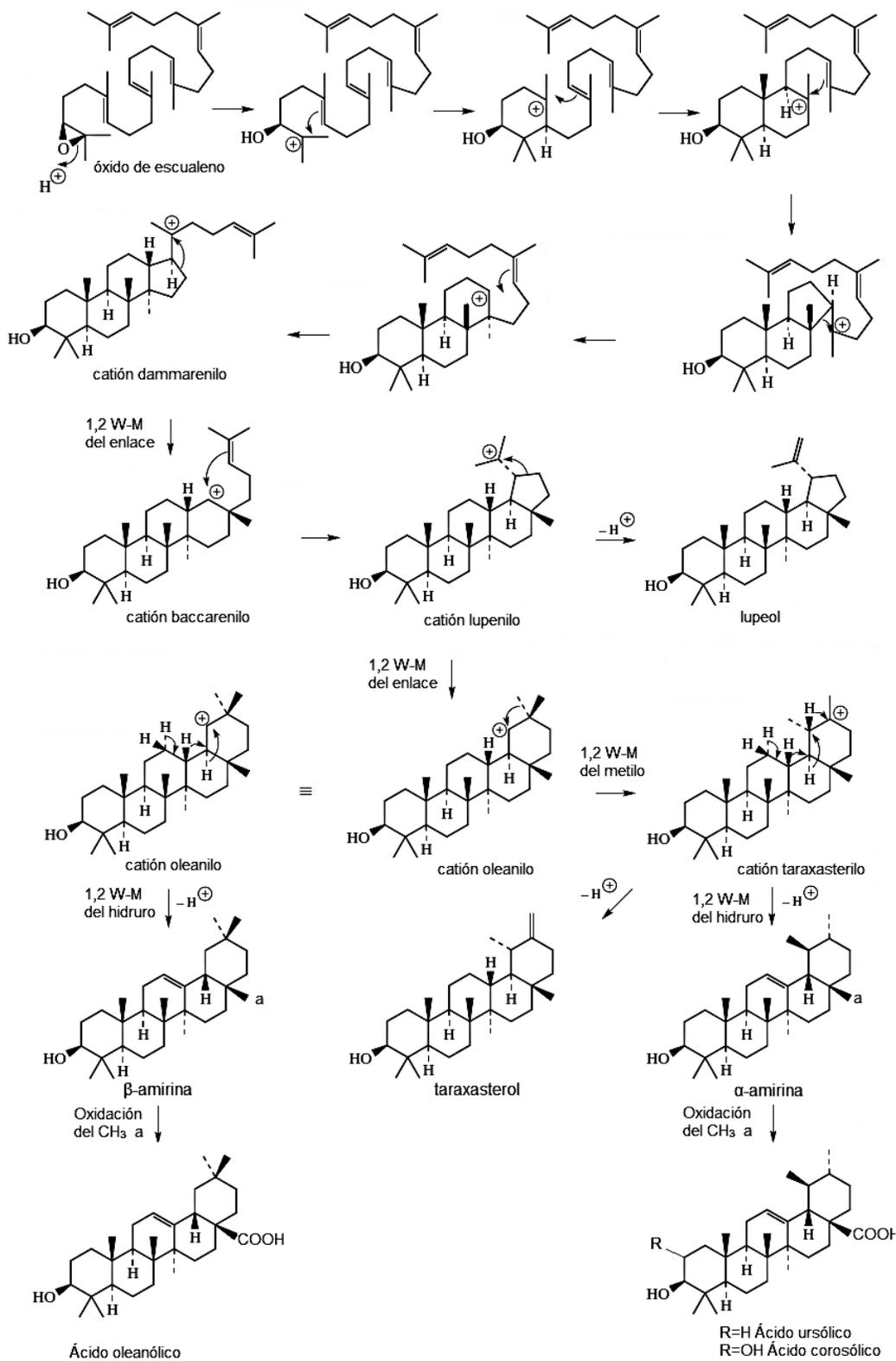


Figura 10. Secuencia de ciclizaciones y movimientos de Wagner-Meerwein de  $\text{H}^+$  y  $\text{Me}^-$  para la generación de diversos derivados.

Las ciclizaciones son mediadas por un carbocatión y proceden en una secuencia paso a paso, de tal manera que la protonación del grupo epóxido permite la apertura de este anillo y la generación de un carbocatión terciario, el cual queda posicionado adecuadamente para permitir la adición electrofílica a un doble enlace, la formación de un anillo de seis miembros y la formación de un nuevo carbocatión terciario. Este proceso continúa dos veces más, generando el carbocatión terciario preferido (adición Markovnikov) después de cada formación del anillo. Aunque el cuarto anillo formado es por consiguiente uno de cinco miembros, éste es ampliado a un anillo de seis miembros a través de un desplazamiento de Wagner-Meerwein 1,2 de un alquilo, a expensas de sacrificar un carbocatión terciario por uno secundario, resultando en una disminución de la tensión del anillo. Una posterior adición electrofílica genera el catión dammarenilo terciario. La mayoría de los triterpenoides y esteroides naturales contienen un grupo hidroxilo en la posición 3, el cual proviene del epóxido original, el óxido de escualeno (Fig. 10) (Dewick, 2002).

Los reordenamientos Wagner-Meerwein no deberían ocurrir en el catión dammarenilo ya que éste puede ser inactivado con agua, dando lugar a los dammarenedioles epiméricos. Sin embargo, la migración se presenta para disminuir la tensión del anillo de cinco miembros mediante la creación de un anillo de seis (catión baccarenilo); esto ocurre a expensas de sacrificar un carbocatión terciario por uno secundario. Ahora, un sistema de anillos pentacíclico puede ser formado por ciclización sobre el doble enlace, dando un nuevo anillo de cinco miembros y el catión terciario lupenilo. La pérdida de un protón del catión lupenilo da lupeol. La expansión del anillo en el catión lupenilo por la migración del enlace da el sistema oleanilo, y este ion pierde su carga por las migraciones de hidruro y la pérdida de un protón, dando la  $\beta$ -amirina. La formación de la  $\alpha$ -amirina isomérica implica primero la migración de un metilo en el catión oleanilo, luego la desprotonación del nuevo catión taraxasterilo mediante tres migraciones de hidruro y la pérdida de un protón. La pérdida de un protón del metilo no migrado en el catión taraxasterilo es una forma alternativa de lograr una molécula neutra y

generar taraxasterol (Fig. 10). Las dos amirinas pueden ser consideradas como precursoras de algunos ácidos triterpénicos como el ursólico, el oleanólico y el corosólico (Dewick, 2002).

#### 2.3.4.2.4. Función biológica de los terpenoides

En hábitas naturales, las plantas están rodeadas por un gran número de enemigos potenciales. Casi todos los ecosistemas contienen una amplia variedad de bacterias, virus, hongos, nemátodos, arácnidos, insectos, mamíferos y otros animales herbívoros. Por su naturaleza, las plantas no pueden escapar de herbívoros y patógenos por lo que deben protegerse de otras formas (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003).

Los metabolitos secundarios no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también una síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas, tales como el consumo por herbívoros, el ataque por microorganismos, la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abióticos. Se sabe que a un microorganismo patógeno o a insectos vertebrados herbívoros, les resulta más difícil infectar o alimentarse de una población de plantas que individualmente contienen mezclas diferentes de metabolitos secundarios, que de una población con una mezcla homogénea de metabolitos secundarios. El daño que se produce, tanto por la depredación por insectos como por el daño mecánico inducido por factores físicos, representa condiciones que se traducen en una respuesta de defensa de la planta, la cual involucra la activación transcripcional de diversos genes de proteínas necesarias para la supervivencia y la prevención de la invasión por microorganismos patógenos (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003).

Particularmente, los terpenos son toxinas y repelentes para un gran número de insectos y mamíferos que se alimentan de plantas, de forma que parece que desempeñan un importante papel defensivo en el reino vegetal. Por ejemplo, los ésteres de monoterpenos llamados piretroides que se encuentran en las hojas y flores de especies de *Chrysantenum* tienen una actividad insecticida muy elevada (Croteau *et al.*, 2000).

Además de la función que tienen los terpenos en las plantas, éstos son una fuente importante para el tratamiento de diversas enfermedades desde el punto de vista de la química medicinal. Por ejemplo, algunos triterpenos pentacíclicos, como los ácidos oleanólico, maslínico, corosólico y ursólico, poseen diversas actividades farmacológicas, entre las que se encuentran las actividades antimicrobiana, antiinflamatoria, anticancerosa, antiplaquetaria y la actividad vasorrelajante (Alqahtani *et al.*, 2013).

Se ha reportado que el ácido ursólico posee un efecto asorelajante, el cual es mediado a través de la activación de la vía del NO-GMPc, por lo que su efecto se considera dependiente del endotelio. Este ácido es capaz de activar la eNOS, por lo que produce la liberación de NO y por lo tanto induce la vasorrelajación sobre la aorta torácica aislada de rata ( $CE_{50} = 44.15 \pm 6.1 \mu\text{M}$  y  $E_{\text{máx}} = 97.2 \pm 2.1 \%$ ) (Aguirre-Crespo *et al.*, 2006).

En relación al ácido corosólico, se ha reportado que una dieta alta en concentraciones de este ácido (0.072 %) durante 14 semanas, disminuye, entre otros factores, los niveles de presión arterial en ratas con síndrome metabólico. Según los autores, lo anterior implica que el ácido corosólico puede ser benéfico para la prevención de enfermedades cardiovasculares, las cuales son un problema de salud creciente en todo el mundo (Yamaguchi *et al.*, 2006). Además, se ha reportado el efecto vasorrelajante que tiene este ácido sobre aorta aislada de rata ( $CE_{50} = 51.3 \pm 2.8 \mu\text{g/ml}$  y  $E_{\text{máx}} = 87.5 \pm 4.2 \%$ ) (Luna-Vázquez, 2014).

### 2.3.5. Extractos estandarizados de *Crataegus* spp.

Actualmente, existen dos extractos obtenidos de *Crataegus* spp., WS1442® y LI132, los cuales son estandarizados para su comercialización. LI132 es obtenido a partir de las flores y hojas de *C. oxyacantha* y está estandarizado a una concentración de 2.2% de flavonoides, determinada por la concentración de hiperósido. Este extracto se comercializa principalmente en China (Verma *et al.*, 2007).

Por otro lado, WS1442® es obtenido a partir de las flores y hojas de las especies *C. oxyacantha* y *C. monogyna* mediante una extracción con etanol acuoso al 45% [masa/masa (m/m)]. Este extracto es estandarizado a una concentración de 17.3 a 20.1 % de procianidinas oligoméricas determinadas mediante la concentración de epicatequina, la cual fue utilizada como el marcador químico. Actualmente, WS1442® es uno de los medicamentos aprobados para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca clase II por la New York Heart Association (NYHA) en varios países europeos. WS1442® consta de tres fracciones: la fracción A lipofílica, soluble en acetato de etilo, que está enriquecida en derivados de flavona; la fracción B, soluble en agua y de bajo peso molecular; y la fracción C rica en procianidinas oligoméricas y flavonas libres (Brixius *et al.*, 2006).

### 2.3.6. Estudios sobre las actividades farmacológicas de *Crataegus* spp.

Como ya se ha señalado, el endotelio vascular sintetiza una serie de compuestos vasoactivos que pueden ser tanto vasodilatadores como vasoconstrictores. Uno de ellos es la endotelina-1, un potente vasoconstrictor. La síntesis de la endotelina-1 está modulada en parte, por un estímulo mecánico ejercido por el mismo flujo sanguíneo, el cual disminuye esta síntesis y al mismo tiempo aumenta la producción de vasodilatadores como el NO. El aumento de la síntesis de este vasoconstrictor, así como la disminución de otros vasodilatadores, da lugar a la disfunción endotelial. Sin embargo, se ha demostrado que tanto el

jugo preparado a partir de la planta fresca de *C. oxyacantha*, como la tintura obtenida a partir de los frutos de esta misma especie, con un 30 % de etanol (equivalente a 250 mg de fruta/ml), poseen un efecto sobre la síntesis de la endotelina-1 en el endotelio vascular de aorta aislada de bovino. Ambos extractos tuvieron la capacidad de disminuir la síntesis de endotelina-1 basal. Se comparó el efecto obtenido del jugo y del extracto de *C. oxyacantha* con el extracto obtenido de las semillas de la uva, el cual fue utilizado como control positivo. Las concentraciones de los extractos utilizadas fueron en base a la concentración de polifenoles presentes en cada extracto, esta última determinada mediante el reactivo de Follin Ciocalteu en el que se usó como referencia la catequina. De esta forma, las concentraciones fueron expresadas en equivalentes de catequina como  $\mu\text{g/ml}$ . Los resultados demostraron que la tintura de *C. oxyacantha* tuvo una potencia significativamente igual a la producida por el extracto de la uva ( $\text{CI}_{50} = 4.1$  y  $4.6 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente). Sin embargo, el jugo tuvo una potencia significativamente menor ( $\text{CI}_{50} = 26.6 \mu\text{g/ml}$ ). Corder *et al.* sugieren que el efecto podría involucrar la inducción de la fuerza mecánica por parte del flujo sanguíneo sobre las células endoteliales (Corder *et al.*, 2004).

En un estudio publicado por Brixius *et al.* (2006), se investigó el efecto vasorrelajante sobre arteria aislada de rata del extracto WS1442®, así como de cada una de las tres fracciones que lo componen (A, B y C descritas en el punto 2.3.5). Estos resultados mostraron que las fracciones A y B no tuvieron ningún efecto sobre la contracción de los tejidos precontraídos con fenilefrina, mientras que la fracción C resultó ser significativamente igual de activa y potente ( $E_{\text{máx}} = 86.7 \pm 1.7$  % de relajación y  $\text{CE}_{50} = 14.0 \pm 3.2$ , respectivamente) que el extracto WS1442® ( $E_{\text{máx}} = 79.2 \pm 5.8$  % de relajación y  $14.6 \pm 2.6 \mu\text{g/ml}$ ). El mecanismo de acción por el cual el extracto WS1442®, y por lo tanto la fracción C, llevan a cabo tal efecto fue elucidado como dependiente de endotelio. Se observó que WS1442® activa la eNOS mediante la fosforilación de esta enzima en la posición serina 1177 (Brixius *et al.*, 2006).

Se ha señalado que el endotelio vascular tiene un papel importante en la disfunción endotelial y por lo tanto en la hipertensión arterial. En este sentido, se han hecho estudios donde se ha abordado el efecto que tiene WS1442® sobre la homeostasis de este sistema. Un estudio publicado recientemente ha reportado que este extracto tiene la capacidad de prevenir la hiperpermeabilidad endotelial inducida por histamina y trombina, tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando células endoteliales de la vena umbilical humana y de vénulas postcapilares de ratones macho modelo C57BL/6NCrl, respectivamente (Bubik *et al.*, 2012). Un análisis de Western Blot reveló que el extracto WS1442® tiene un efecto preventivo sobre las proteínas de unión adherentes del endotelio vascular, ya que se observó que este extracto inhibe la fosforilación, inducida por trombina, de tales proteínas, específicamente sobre la caderina-VE. También se observó un efecto preventivo sobre las proteínas del citoesqueleto y las involucradas en la contracción de las células endoteliales, donde se observó que el extracto fue capaz de disminuir el incremento de actina filamentosa, y por lo tanto de disminuir las fibras de estrés formadas por esta proteína. Dichas fibras de estrés tienen un efecto directo sobre la hiperpermeabilidad endotelial. Así mismo, se observó una disminución en la fosforilación, inducida por trombina, de la cadena ligera de miosina, lo cual disminuyó la contractilidad endotelial. Los mecanismos moleculares por los cuales WS1442® actúa para llevar a cabo tales efectos farmacológicos involucran la disminución de calcio intracelular, la inhibición de la fosforilación, y por lo tanto de la activación de la PKC, la disminución de RhoA activa y el aumento de los niveles de AMPc y con ello el incremento de la activación de la PKA. Bubik *et al.* proponen que WS1442® tiene la capacidad de activar Epac mediante el aumento de los niveles de AMPc, y con ello activa a Rap1, la cual activa posteriormente a factores intercambiadores de guanosina, dando como resultado la activación de una proteína de la familia de las GTPasas llamada Rac. Esta secuencia de procesos bioquímicos provoca una reorganización cortical de actina, lo que promueve una menor permeabilidad endotelial (Bubik *et al.*, 2012).

Uno de los factores de riesgo para contraer HTA es el envejecimiento. Un estudio realizado por Idris-Khodja *et al.* (2012) reportó que el envejecimiento disminuye la capacidad de relajación, inducida por ACh, de las arterias mesentéricas aisladas de ratas adultas pre-contraídas con fenilefrina. Sin embargo, se demostró que esta capacidad es restaurada tras haber contado con una ingesta crónica por 40 semanas de 100 mg/kg/día del extracto WS144®. Este estudio demostró que uno de los principales efectos del envejecimiento sobre la relajación es la disminución en la producción del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), un potente vasodilatador. Así mismo, se observó una disminución en la formación de NO basal; sin embargo, ésta no afectó la capacidad de relajación mediada por ACh de la arteria mesentérica pero sí la capacidad que tiene la arteria de disminuir las respuestas contráctiles inducidas por fenilefrina.

Otros compuestos importantes sintetizados por el endotelio vascular son los prostanoideos derivados de las ciclooxigenasas (COX) 1 y 2. Algunos de ellos como la PGE<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub> tienen efectos vasoconstrictores en la musculatura lisa. Se ha reportado que la inhibición de COX 1 y 2 y del receptor de tromboxano mediante indometacina y GR32191B, respectivamente, restablece la capacidad de la arteria mesentérica para relajarse, a través de la inducción con ACh en ratas adultas. Idris-Khodja *et al.* (2012) también han reportado que WS1442® disminuye la expresión de COX 1 y COX 2, dos ciclooxigenasas que se ven sobreexpresadas en edades adultas en la arteria mesentérica de ratas adultas. Además, estos autores demostraron, mediante un ensayo fluorescente oxidativo, que WS1442® disminuye la formación de EROs *in situ*, las cuales también se ven incrementadas cuando se presenta envejecimiento. Los autores concluyeron que estas propiedades del extracto permiten prevenir la disfunción endotelial, ya que un incremento en la producción de EROs lleva a una menor biodisponibilidad de NO, debido a que especies como el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•</sup>) reaccionan con el NO que da lugar al peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), el cual a su vez se degrada a otros agentes oxidantes, el radical hidroxilo y el nitrato (Idris-Khodja *et al.*, 2012).

Por otro lado, es bien conocida la relación que existe entre la ingesta de sodio y la prevalencia de padecer HTA. Se ha propuesto que WS1442® tiene un efecto positivo sobre la modulación estructural del glicocalix endotelial y esto se ha relacionado directamente con la capacidad de permeabilidad del glicocalix para ciertos iones como el sodio. En este sentido, se ha propuesto a este extracto como una alternativa para prevenir la HTA, ya que cuando se aumenta la ingesta de sodio, éste tiende a ser absorbido y más aún si el sistema de permeabilidad endotelial (glicocalix) está dañado. Una mayor absorción de sodio produce también mayor retención de agua y con ello se verá aumentado el volumen sanguíneo, lo cual incrementa directamente la presión arterial (Peters *et al.*, 2012).

Actualmente, se ha descrito que los glóbulos rojos poseen una enzima que es capaz de sintetizar óxido nítrico. Este nuevo aporte ha llamado el interés de las investigaciones que abordan el tema de la disfunción endotelial, ya que han visto este enfoque como un coadyuvante para el mejoramiento de la función endotelial y con ello una estrategia para tratar la HTA. Después de este hallazgo, Rieckeheer *et al.* publicaron un estudio en el que se determinó si WS1442® era capaz de activar tal enzima y con ello aumentar la producción de NO. Los resultados demostraron que WS1442® es capaz de activar esta enzima y con ello aumentar la producción de NO de una manera dependiente del tiempo y de la concentración, sin afectar el índice de elongación de los glóbulos rojos (Rieckeheer *et al.*, 2011).

En cuanto a especies mexicanas de *Crataegus*, la información sobre sus actividades farmacológicas es muy escasa. El primer trabajo publicado en 2010 por Arrieta *et al.*, investigó específicamente la actividad relajante de los extractos orgánicos obtenidos a partir de las hojas de *C. mexicana*, sobre la tráquea de cobayos. El extracto más activo fue el hexánico, del cual se elucidó el mecanismo de acción. Se observó que el extracto tuvo un efecto relajante significativamente mayor cuando los tejidos fueron contraídos con KCl y con histamina que cuando se utilizó carbacol. Como se sabe, las contracciones inducidas por histamina y KCl

son dependientes de la concentración de calcio, específicamente mediante un incremento de la afluencia de calcio extracelular a través de la membrana. De este modo, esos autores consideran que uno de los mecanismos por los cuales puede estar actuando el extracto hexánico podría ser a través del bloqueo de canales de calcio activados por voltaje (Arrieta *et al.*, 2010).

Con anterioridad, nuestro grupo ha investigado el efecto vasorrelajante sobre aorta aislada de rata de los extractos acuosos y orgánicos obtenidos a partir de frutos y hojas de *C. mexicana*, respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron que todos los extractos evaluados indujeron un efecto vasorrelajante. Sin embargo, el extracto metanólico obtenido de las hojas, al igual que su homólogo obtenido de *C. gracilior*, mostró un efecto máximo ( $E_{\text{máx}} = 91.65\% \pm 4.7\%$ ) y una potencia ( $CE_{50} = 1.53 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ ) significativamente mayor que los demás extractos (Soto-Zarazúa, 2013).

#### 2.3.7. Estudios sobre la eficacia y seguridad de *Crataegus* spp.

Las dosis recomendadas para el uso de extractos estandarizados de especies de *Crataegus* van de 160 a 1800 mg/día, dependiendo de la especie, las partes usadas, o bien, del extracto utilizado. Sin embargo, los médicos recomiendan dosis efectivas a partir de 600 hasta 1800 mg/día, basándose en su propia experiencia con pacientes (Verma *et al.*, 2007).

En el caso de *C. oxyacantha* y de *C. monogyna*, se ha recomendado una dosis de 250 mg del extracto LI132 y 300 mg para WS1442®, tres veces al día, o bien 300 mg del fruto de estas especies, tres veces al día (Verma *et al.*, 2007).

Es conocido que el uso de los extractos estandarizados de *C. oxyacantha* y de *C. monogyna* es seguro y sus efectos colaterales son mínimos cuando se utilizan en dosis recomendadas, pero al incrementar las dosis, se puede observar hipotensión y/o sedación. Los efectos adversos más comunes son disnea, vértigo, complicaciones gastrointestinales, dolor de cabeza, migraña y palpitaciones. Entre

las interacciones con otros fármacos que tienen efectos sobre el sistema cardiovascular, se ha observado un sinergismo con fármacos digitálicos al potenciar el efecto de los glucósidos cardíacos. Este efecto es atribuido a la inhibición que tiene LI132 sobre la fosfodiesterasa del AMPc, y por lo tanto, sobre canales de calcio. Además, el uso de *C. oxyacantha* con  $\beta$ -bloqueantes puede provocar un aumento leve de la presión arterial en pacientes hipertensos, ya que dichos agentes disminuyen el gasto cardíaco en estos pacientes (Verma *et al.*, 2007).

La única situación para contraindicar el uso de *Crataegus* spp. es en el caso de embarazo, ya que se ha observado una estimulación potencial del útero (Dahmer y Scott, 2010).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades cardiovasculares adquieren cada vez mayor preponderancia en todo el mundo y actualmente se han expandido a los países en vías de desarrollo tales como México. Estas enfermedades son una de las primeras causas de muerte a nivel mundial; así lo señala la OMS. Dentro las enfermedades cardiovasculares, la HTA es una de las enfermedades más frecuentes, dado que afecta al 35% de la población mundial.

Existe una serie de medicamentos bien establecidos para el tratamiento de la HTA. Sin embargo, estos fármacos conllevan efectos secundarios que varían de acuerdo al tipo de medicamento empleado. Algunos de los efectos adversos más comunes son: deshidratación, hiperglucemia, resistencia a la insulina, anorexia, náuseas y estreñimiento. Además, estos medicamentos solo son accesibles a cierto sector de la población, debido en muchas ocasiones a su alto costo. Aunado a esto, los medicamentos existentes no han logrado disminuir las cifras de HTA en México desde el año 2006 hasta la fecha. Por lo tanto, una proporción importante de la población recurre a los remedios tradicionales, principalmente las plantas medicinales y alimenticias. Esto plantea la necesidad de investigar el potencial de las plantas medicinales de uso tradicional arraigado para la búsqueda de alternativas de tratamiento.

Las especies de *Crataegus* tienen gran potencial para tratar los padecimientos cardiovasculares. Sin embargo, desde el punto de vista químico y farmacológico, las pocas especies estudiadas se encuentran en los continentes asiático y europeo a pesar de que México es un país que alberga 15 especies pertenecientes a este género. Es por ello que el presente proyecto está enfocado

a generar conocimiento sobre los compuestos químicos y el potencial vasorrelajante que poseen los frutos y las hojas de *Crataegus gracilior*.

#### **4. HIPÓTESIS**

Las hojas y los frutos de *Crataegus gracilior* Phipps (Rosaceae) contienen metabolitos secundarios que ejercen un efecto vasorrelajante sobre aorta aislada de rata.

#### **5. OBJETIVOS**

##### 5.1. Objetivo general

- Determinar la actividad vasorrelajante de los extractos acuosos y orgánicos obtenidos respectivamente de frutos y hojas de *C. gracilior* e identificar algunos de sus metabolitos secundarios.

##### 5.2. Objetivos particulares

- Determinar el efecto vasorrelajante sobre aorta aislada de rata de los extractos acuosos y orgánicos obtenidos a partir de frutos y hojas, respectivamente, de *C. gracilior*.
- Comparar, mediante curvas concentración-respuesta, la potencia y eficacia de los extractos analizados.
- Purificar e identificar algunos de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto más potente y/o eficaz.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Recolección y conservación del material vegetal

Se recolectaron frutos y hojas de *C. gracilior* el 7 de noviembre del 2012 en el Municipio de Pinal de Amoles, Querétaro, en las coordenadas 21° 8' 3" latitud norte y 99° 37'31" longitud oeste, a una altitud de 2350 msnm. La identificación taxonómica fue realizada por el M. en C. Alejandro Cabrera de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Una muestra de identificación (A. Cabrera 5667) fue depositada en el herbario "Jerzy Rzedowski" (QMEX) ubicado en la Facultad de Ciencias Naturales, UAQ, Campus Juriquilla. Las hojas fueron sometidas a un proceso de secado mediante una estufa a una temperatura de 40 °C, mientras que los frutos fueron congelados a -5 °C hasta su uso.

### 6.2. Obtención de extractos

#### 6.2.1. Extractos de las hojas secas

Se pesaron 1600 g de hojas secas, las cuales fueron sometidas a un proceso de molienda, mediante un molino manual. Posteriormente, se realizaron extracciones mediante maceración con hexano, diclorometano y finalmente con metanol, con un tiempo de maceración de una semana con cada disolvente, obteniéndose de esta forma tres extractos: el hexánico (MHH), el diclorometánico (MDH) y el metanólico (MMH). Al término de cada extracción, se filtraron los extractos, los cuales fueron secados mediante presión reducida y con la ayuda de un rotaevaporador. Los extractos secos se mantuvieron a una temperatura de 4°C hasta su uso.

#### 6.2.2. Extractos de los frutos frescos

Se pesaron 1285 g de frutos descongelados, los cuales fueron despojados de sus semillas de modo manual. El peso final de fruto fue de 1.061 kg, del cual la mitad se sometió a un proceso de decocción (DAF) por dos horas y la otra mitad a un proceso de maceración (MAF) por una semana, ambos utilizando agua como solvente de extracción. Para evitar el crecimiento de hongos, la maceración se realizó con un 2% de MeOH. Posteriormente, ambos extractos fueron sometidos a un proceso de congelación seguido por una liofilización. Los extractos liofilizados fueron almacenados a 4°C hasta su uso.

### 6.3. Evaluación de la actividad vasorrelajante *ex vivo*

#### 6.3.1. Preparación de los extractos

Los dos extractos acuosos obtenidos a partir de los frutos de *C. gracilior* (MAF y DAF) fueron disueltos en agua. Por otra parte, el extracto metanólico obtenido de las hojas (MMH) fue disuelto en DMSO, mientras que los extractos hexánico y el diclorometánico (MHH y MDH, respectivamente) fueron disueltos en Tween 80 y posteriormente diluidos con agua destilada. La concentración utilizada de Tween 80 y de DMSO para disolver las muestras fue menor del 2%. Todos los extractos fueron preparados en concentraciones de 1, 3.16, 10, 31.6, 100, 316 y 1000 µg/ml.

#### 6.3.2. Ensayo farmacológico

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de un peso entre 250 y 300 g, las cuales fueron proporcionadas por el Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla. Los animales fueron anestesiados con cloroformo y sacrificados por decapitación. En seguida, se removió la aorta torácica y se colocó en una solución fría de Krebs-Heinseleit (pH 7.4). Posteriormente, se removió de la aorta el tejido adiposo y conectivo y se cortó en anillos de 4-5 mm. Los anillos fueron colocados en cámaras de incubación de 7 ml con solución de Krebs-Heinseleit a 37°C y burbujeo constante de una mezcla de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Los tejidos fueron estabilizados durante 60 min bajo una tensión de 1.5 g a 37 °C. Durante este período, el medio del baño se cambió cada 15 min. Después

del ajuste final a la tensión basal de 1.5 g, los segmentos de aorta fueron contraídos con KCl (100 mM) para sensibilizar el tejido. Una vez estable la contracción inducida por el KCl, el medio del baño se cambió tres veces hasta que se recuperó la tensión basal de 1.5 g. Después de reestablecida la tensión basal, los tejidos fueron nuevamente contraídos ahora con fenilefrina (1  $\mu$ M), registrando el grado de contracción. La viabilidad del tejido fue evaluada en un segmento de aorta representativo mediante la determinación de la relajación inducida por acetilcolina (ACh) (1  $\mu$ M). La ACh fue utilizada como control positivo utilizando las mismas concentraciones que fueron preparadas para los extractos. Los cambios en la tensión isométrica se midieron por medio de transductores de fuerza Grass Modelo FT03 acoplados a un polígrafo Grass de 6 canales Modelo 7-8P y la información fue procesada por el programa PolyView (Grass). Las respuestas relajantes fueron expresadas en porcentaje en base a la contracción inicial alcanzada al adicionar la fenilefrina (Ibarra-Alvarado *et al.*, 2007).

#### 6.3.3. Análisis estadísticos en los ensayos farmacológicos

Todas las evaluaciones fueron realizadas por triplicado y se determinó la media y la desviación estándar de cada una. Posteriormente, se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) para conocer el comportamiento del efecto del extracto sobre el músculo liso arterial, utilizando una ecuación sigmoideal y de esta forma determinar la  $CE_{50}$  y el  $E_{m\acute{a}x}$ . Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por una prueba de Tuckey para evaluar la diferencia significativa entre las medias con ayuda del programa PRISMA 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con  $p \leq 0.05$ .

### 6.4. Estudios químicos

#### 6.4.1. Fraccionamiento a gran escala del extracto MMH

De acuerdo a los resultados obtenidos de la evaluación farmacológica, se seleccionó el extracto metanólico para llevar a cabo el aislamiento y la purificación de compuestos a gran escala, mediante cromatografía en columna abierta de fase

normal. Se pesaron 46 g del extracto, los cuales fueron adsorbidos en 46.1 g de gel de sílice (Kiesegel 60 Merck, malla de 70-230, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm). Después, se empacó una columna de 10 cm de diámetro por 110 cm de alto, utilizando 856 g del mismo gel de sílice empleado para la adsorción de la muestra. Posteriormente, se llevó a cabo la elución comenzando con hexano para desengrasar y continuando con disolventes de creciente polaridad y en diferente proporción hasta terminar con una fase móvil constituida por metanol.

#### 6.4.2. Análisis cromatográfico de las fracciones mediante CCF

Cada una de las fracciones obtenidas fue monitoreada para determinar su complejidad mediante cromatografía en capa fina (CCF), utilizando cromatofolios recubiertos con gel de sílice (sílica gel 60 GF<sub>254</sub> Merck) y con la ayuda de una lámpara ultravioleta de longitud de onda corta (254 nm) y larga (365 nm) para visualizar los compuestos. Posteriormente, se realizó el revelado mediante rociado con una solución de sulfato cérico amoniacal, seguido de calentamiento a 80 °C. Después, se continuó con la evaluación farmacológica de las fracciones con mayor rendimiento.

#### 6.4.3. Preparación del agente revelador

A 300 g de hielo, se adicionaron 12 g de sulfato cérico amoniacal  $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4]$  y lentamente y con agitación 22.5 ml de ácido sulfúrico concentrado hasta que se formó una solución homogénea, la cual fue directamente utilizada para revelar las placas.

#### 6.4.4. Determinación de ácido ursólico mediante CCF

Se llevó a cabo la determinación de ácido ursólico en todos los extractos obtenidos de las hojas (MMH, MHH y MDH) así como en las fracciones con mayor rendimiento obtenidas del fraccionamiento a gran escala. La determinación se hizo mediante CCF, con las mismas características del punto 6.4.2, comparando los  $R_f$  del estándar y de la muestra. Los tres sistemas de elución que se utilizaron fueron

hexano:acetato de etilo (6:4), diclorometano:acetato de etilo (1:1) y hexano:acetona (7:3).

#### 6.4.5. Purificación de compuestos

Para la purificación de compuestos, se seleccionó una de las fracciones obtenidas del fraccionamiento a gran escala del extracto MMH utilizando como criterios de selección el perfil cromatográfico, la actividad vasorrelajante y la abundancia.

De acuerdo a lo anterior, se prosigió con la purificación de algunos de los compuestos de la fracción F8 (Cuadro 3), mediante CCF a nivel preparativo (CCFP), utilizando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (slica gel 60 GF<sub>254</sub> Merck, 2 mm de espesor) y como fase móvil, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (95:5). Las placas fueron eluidas dos veces. Se realizaron 6 placas preparativas en las cuales se aplicaron en cada una de ellas 30 mg de la fracción disuelta en una mezcla de metanol-diclorometano (1:3) para obtener un rendimiento de 10 mg aproximadamente para cada compuesto y de este modo poder registrar sus espectros de RMN.

Para determinar la pureza de los compuestos, se recurrió en primer lugar a la CCF uni- y bidimensionales, utilizando como sistemas de elución los siguientes: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH (9:1), acetona:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) y acetato de etilo:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3:7).

#### 6.4.6. Identificación de los compuestos purificados

Para la identificación de los compuestos purificados, se recurrió a las diferentes modalidades de la RMN (uni- y bidimensionales, tanto homonucleares <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, como heteronucleares <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C) y de esta manera se obtuvieron sus datos espectroscópicos, los cuales fueron comparados con los datos de la literatura. El equipo de RMN utilizado fue un Varian Inova 400 MHz (RMN <sup>1</sup>H) y 100 MHz (RMN <sup>13</sup>C).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Rendimiento de los extractos

El rendimiento de cada extracto se determinó en base al material vegetal pesado. En el Cuadro 1, se muestra que de los extractos obtenidos a partir de las hojas, el extracto MMH fue el que tuvo un mayor rendimiento, mientras que los dos extractos obtenidos a partir de los frutos (DAF y MAF) tuvieron rendimientos similares.

Cuadro 1. Rendimiento de los extractos obtenidos de hojas y frutos de *C. gracilior*.

Extracto <sup>1</sup>	Rendimiento (m/m)
DAF	6.73 %
MAF	7.25 %
MHH	0.37 %
MDH	1.65 %
MMH	13.77 %

<sup>1</sup>DAF: decocción de los frutos, MAF: maceración de los frutos, MHH: maceración hexánica de las hojas, MDH: maceración diclorometánica de las hojas, MMH: maceración metanólica de las hojas.

### 7.2. Evaluación farmacológica de los extractos

Los resultados obtenidos de la evaluación farmacológica mostraron que todos los extractos evaluados tuvieron efecto vasorrelajante. Sin embargo, se observó que los extractos MHH y MDH fueron los que presentaron una eficacia ( $E_{\text{máx}} = 18.52 \pm 4.1$  y  $37.58 \pm 5.1$  %, respectivamente) menor. Respecto a los otros

tres extractos, MAF, DAF y MMH, se observó que sus eficacias ( $E_{m\acute{a}x} = 93.83 \pm 6.2$ ,  $96.89 \pm 5.0$  y  $94.60 \pm 5.4$  %, respectivamente) fueron similares. Por otro lado, estos datos fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) con respecto al de la ACh ( $E_{m\acute{a}x} = 69.50 \pm 5.7$  %) usada como control positivo (Fig. 11 y Cuadro 2).

En cuanto a la concentración efectiva media, al comparar los extractos que tuvieron  $E_{m\acute{a}x}$  similares (DAF, MAF y MMH), se observó que el extracto MMH fue el que presentó una  $CE_{50}$  ( $8.70 \pm 4.3$   $\mu\text{g/ml}$ ) significativamente menor ( $p < 0.05$ ), mientras que comparada con la  $CE_{50}$  de la ACh ( $8.67 \pm 0.8$   $\mu\text{g/ml}$ ) fue similar (Fig. 11 y Cuadro 2).

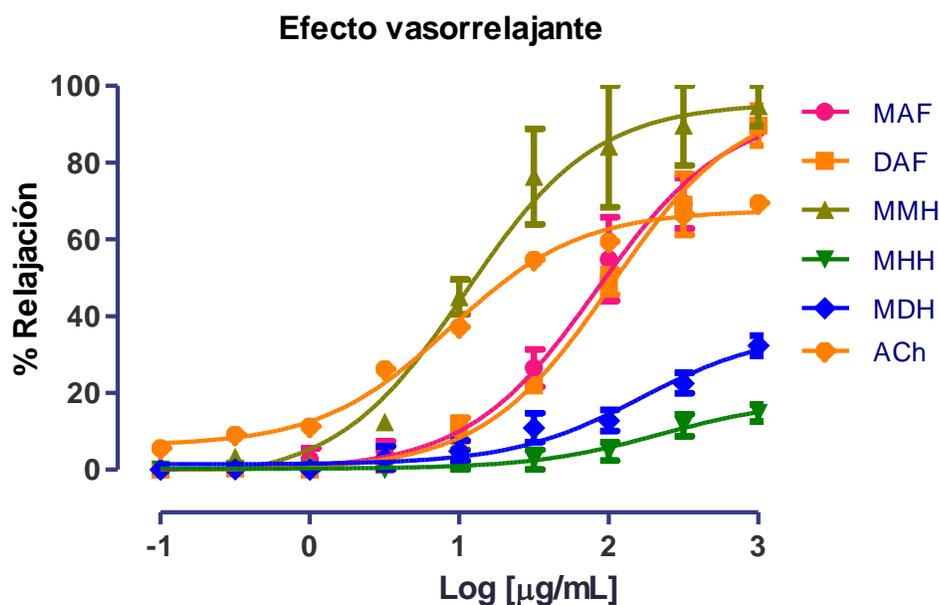


Figura 11. Curvas concentración-respuesta generadas por los diferentes extractos de *C. gracilior*.

Cuadro 2. Valores de  $E_{m\acute{a}x}$  y  $CE_{50}$  obtenidos a partir de CCR de los diferentes extractos de *C. gracilior*.

Extracto	Porcentaje de relajación*	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )*
MAF	$93.83 \pm 6.2^a$	$83.14 \pm 27.2^a$
DAF	$96.89 \pm 5.0^a$	$104.80 \pm 23.8^a$

MMH	94.60 ± 5.4 <sup>a</sup>	8.70 ± 4.3 <sup>b</sup>
MDH	37.58 ± 5.1 <sup>b</sup>	206.00 ± 74.9 <sup>a</sup>
MHH	18.52 ± 4.1 <sup>b</sup>	237.10 ± 51.7 <sup>a</sup>
<b>ACh (control)</b>	69.50 ± 5.7 <sup>c</sup>	8.67 ± 0.8 <sup>b</sup>

<sup>a,b y c</sup>: Valores significativamente diferentes.  $p \leq 0.05$ .

La menor  $CE_{50}$  observada para los diferentes extractos fue la del MMH ( $8.7 \pm 4.3 \mu\text{g/ml}$ ), la cual resultó ser mayor a la observada por Kim *et al.* a partir de un extracto obtenido de *C. oxyacantha* y *C. monogyna* ( $27.5 \mu\text{g/ml}$ ), en el que se midió la misma actividad farmacológica. Aunque solo se presenta gráficamente el  $E_{\text{máx}}$  de este extracto, se puede observar que este es comparable con el producido por el extracto MMH ( $E_{\text{máx}} = 94.60 \pm 5.4 \%$ ). Por lo tanto, se puede afirmar que las hojas de *C. gracilior* tienen una potencia y una eficacia similar a la del extracto de *C. oxyacantha* y *C. monogyna* (Kim *et al.*, 2000).

Por otro lado, al comparar los efectos máximos en relación a la actividad vasorrelajante de *C. gracilior* con los reportados para el extracto WS1442®, se observó que el extracto MMH alcanzó su  $E_{\text{máx}}$  desde una concentración de  $100 \mu\text{g/ml}$ , la cual fue similar a la reportada para el extracto WS1442® ( $74.8 \pm 5.7 \%$ ). En relación a sus  $CE_{50}$ , el MMH presentó también una  $CE_{50}$  ( $8.7 \pm 4.3 \mu\text{g/ml}$ ) similar a la del extracto WS1442® ( $7.4 \pm 1.7 \mu\text{g/ml}$ ) (Brixius *et al.*, 2006). Lo que indica que el extracto MMH tienen una eficacia y una potencia similar a las del extracto estandarizado comercial WS1442® (Brixius *et al.*, 2006).

En cuanto a especies mexicanas de *Crataegus*, los pocos estudios que se tienen sobre sus actividades farmacológicas permiten comparar los resultados de *C. gracilior* con los obtenidos para *C. mexicana* reportados por nuestro mismo grupo de trabajo, donde se observó que esta última especie posee una potencia ( $CE_{50} = 1.53 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ ) estadísticamente mayor ( $p < 0.05$ ) a la de *C. gracilior* ( $8.70 \pm 4.3 \mu\text{g/ml}$ ), aunque con una efectividad similar a la de *C. mexicana* ( $E_{\text{máx}} = 91.65\% \pm 4.7 \%$ ) (Soto-Zarazúa, 2013).

Con lo discutido anteriormente, resulta recomendable determinar la actividad vasorrelajante también de las flores de *C. gracilior* como se ha hecho para otras especies de este género, ya que como se ha reportado, para la preparación de los extractos LI132 y WS1442®, se utilizan tanto las hojas como las flores para lograr obtener la concentración necesaria de compuestos bioactivos para la estandarización, lo que sugiere que las flores también contribuyen de manera importante a las propiedades farmacológicas que se le atribuyen a tales extractos.

Por último, de los extractos polares analizados, se observó que el extracto MMH presentó una eficacia similar a la de los extractos DAF y MAF, aunque el primero resultó ser más potente que estos últimos. Éstos y otros resultados reportados en la literatura como los de Arrieta *et al.* (2010) justifican el uso etnomédico que tienen las hojas en el tratamiento de algunas enfermedades respiratorias, ya que este último demostró que el extracto hexánico obtenido a partir de las hojas de *C. mexicana* posee efecto relajante sobre el músculo liso de la tráquea de cobayo.

### 7.3. Estudios químicos

#### 7.3.1. Fraccionamiento a gran escala del extracto MMH

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación farmacológica, el extracto MMH fue seleccionado para llevar a cabo los estudios químicos. Se obtuvieron en total 193 fracciones del fraccionamiento a gran escala, las cuales fueron agrupadas en 11 fracciones finales de acuerdo a su perfil cromatográfico en CCF. En el Cuadro 3 se presentan las fracciones agrupadas y sus rendimientos, así como los sistemas de elución empleados durante el fraccionamiento.

En el mismo cuadro, se puede observar un cambio de fase móvil muy drástico que fue de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (95:5) a Acetona-MeOH (80:20) para la recolección de las fracciones 119-153. Este cambio se vio reflejado en el fraccionamiento del extracto, ya que como se observa en el mismo cuadro, se

obtuvieron dos fracciones después de este cambio que juntas dieron un peso de 23.06 g (F9), representando más del 50% del peso total del extracto inicial.

Lo anterior indica que después de que se hizo dicho cambio, no hubo un fraccionamiento adecuado, aunque sí refleja la abundancia de compuestos polares presentes en el extracto MMH y ello justifica de alguna forma los resultados obtenidos sobre la actividad vasorrelajante que presentó este extracto. También vale la pena mencionar que este cambio no afectó la fracción F8, de donde se aislaron los correspondientes compuestos. Además, esta fracción presentó un peso de 12.16 g, casi el 25% del peso inicial, lo que indica de alguna manera la abundancia de tales compuestos en el extracto MMH y por ende su abundancia en las hojas.

Cuadro 3. Resumen de las condiciones experimentales de fraccionamiento a gran escala del extracto MMH.

Fracciones colectadas	Fase móvil	Fracciones agrupadas	Clave	Peso (g) ND = no determinado
1-12	Hexano (100%)	1-13	F1	ND
13-25	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (90:10)	14-25	F2	ND
26-51	Hex- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (80:20)	26-55	F3	ND
52-58	Hex- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (50:50)	56-58	F4	ND
59-83	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (100%)	59-61	F5	0.28
84-91	CHCl <sub>3</sub> (100%)	62-67	F6	1.74
92-118	CHCl <sub>3</sub> -MeOH (95:5)	68-96	F7	2.01

119-153	Acetona-MeOH (80:20)	97-119	F8	12.16
154-168	Acetona-MeOH (70:30)	120-121	F9	23.06
169-171	Acetona-MeOH (50:50)	122-171	F10	2.73
172-193	MeOH (100%)	172-193	F11	1.23

### 7.3.2. Análisis cromatográfico de las fracciones mediante CCF

El análisis mediante CCF de las 11 fracciones obtenidas mostró que la fracción F8 tuvo un perfil cromatográfico relativamente más simple que el de las demás fracciones. A continuación, se muestra una fotografía de la placa cromatográfica correspondiente a esta fracción, la cual fue eluida dos veces con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (95:5). Así mismo, se muestra la placa correspondiente a la fracción F9 eluida con CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:1). Cabe mencionar, que no se encontró un sistema de elución óptimo para la elución de esta fracción, lo que refleja la lógica complejidad de la muestra (Fig. 12).

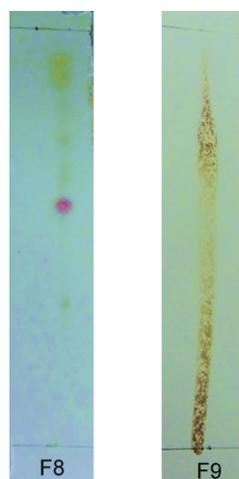


Figura 12. Cromatogramas en capa fina de las fracciones F8 y F9.

En el cromatograma de la fracción F8 (Fig. 12), se observa un compuesto mayoritario que fue identificado como ácido ursólico mediante su  $R_f$  comparado con el de una muestra auténtica y el análisis de sus espectros de RMN. Este compuesto ya había sido reportado en otras especies de *Crataegus* como son *C. pinnatifida* y *C. scabrifolia* (Edwards *et al.*, 2012). Li *et al.* (2007) cuantificaron este compuesto en los frutos maduros de *C. pinnatifida* Bge. var. *major* N.E.Br mediante HPLC y utilizando curvas de calibración, donde determinaron que éste se encontraba en una concentración de 147  $\mu\text{g/g}$  de material fresco. Además, cuantificaron también la presencia de ácido oleanólico, el cual fue encontrado en una concentración de 952  $\mu\text{g/g}$  de material fresco.

### 7.3.3. Determinación de ácido ursólico

La determinación de ácido ursólico mediante CCF indicó la presencia de este compuesto únicamente en el extracto MMH y en la fracción F8 obtenida del fraccionamiento a gran escala de dicho extracto (Fig. 13 y 14). La fase móvil usada para estas placas fue hexano-acetato de etilo (6:4).

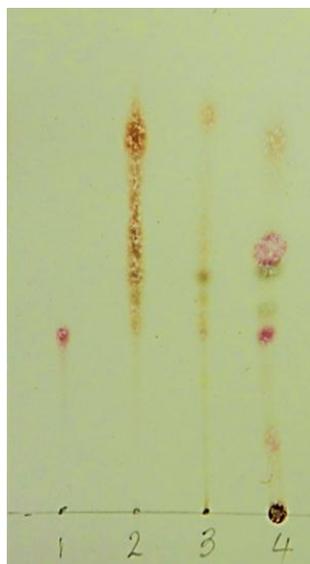


Figura 13. Cromatogramas comparativos de los diferentes extractos y el ácido ursólico. 1) Ácido ursólico, 2) MHH, 3) MDH y 4) MMH

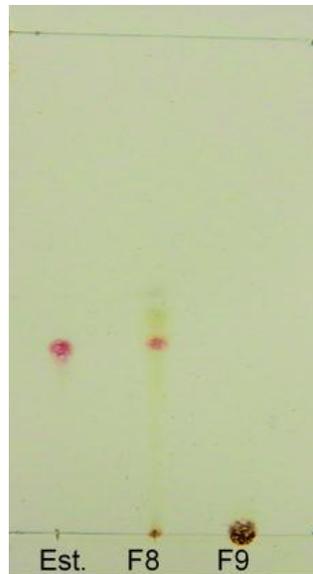


Figura 14. Cromatograma que ilustra la presencia del ácido ursólico en la fracción F8.

Como se comentó en los antecedentes, el ácido ursólico es un compuesto bioactivo al que se le han atribuido diferentes actividades farmacológicas, entre ellas está precisamente su actividad vasorrelajante (Alqahtani *et al.*, 2013). Esto justifica el efecto que presentó la fracción F8 y es claro que uno de los mecanismos por los cuales está actuando esta fracción es por la activación de la vía de NO/GMPc que produce la liberación de óxido nítrico y por lo tanto, vasorrelajación en la aorta aislada de rata (Aguirre-Crespo *et al.*, 2006). Sin embargo, es necesaria la identificación y evaluación de los demás compuestos presentes en dicha fracción para determinar su participación en esta actividad.

La determinación de ácido ursólico en especies mexicanas del género *Crataegus* es una aportación al conocimiento de la diversidad química de estas especies, ya que hasta la fecha no hay ningún estudio donde se haya hecho la determinación de triterpenos en tales especies.

#### 7.5. Evaluación farmacológica de las fracciones

De acuerdo al peso obtenido y al perfil cromatográfico de las fracciones obtenidas, se seleccionaron las fracciones F8 y F9 para llevar a cabo la evaluación farmacológica. Los resultados obtenidos mostraron que ambas fracciones tuvieron

efecto vasorrelajante sobre aorta aislada de rata. En las curvas concentración-respuesta de la Figura 15, se puede observar que la fracción F9 presentó un porcentaje de vasorrelajación de  $89.19 \pm 12.7$ . Sin embargo, como se observa en su misma curva, éste no puede considerarse como su  $E_{m\acute{a}x}$ . Cabe mencionar que no fue posible utilizar concentraciones mayores a  $3160 \mu\text{g/ml}$  para determinar el  $E_{m\acute{a}x}$  de la fracción F9, dado que esta solución adquiriría una consistencia muy espesa a altas concentraciones, lo que impedía que la muestra se disolviera homogéneamente en las cámaras de tejido aislado donde se medía la tensión isométrica.

Por su parte, la fracción F8 sí presentó un  $E_{m\acute{a}x}$  de  $54.07 \pm 2.5 \%$ , el cual fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) que el del extracto MMH ( $E_{m\acute{a}x} = 94.60 \pm 5.4 \%$ ), pero similar al de la ACh ( $E_{m\acute{a}x} = 69.5 \pm 5.7 \%$ ) (Fig. 15).

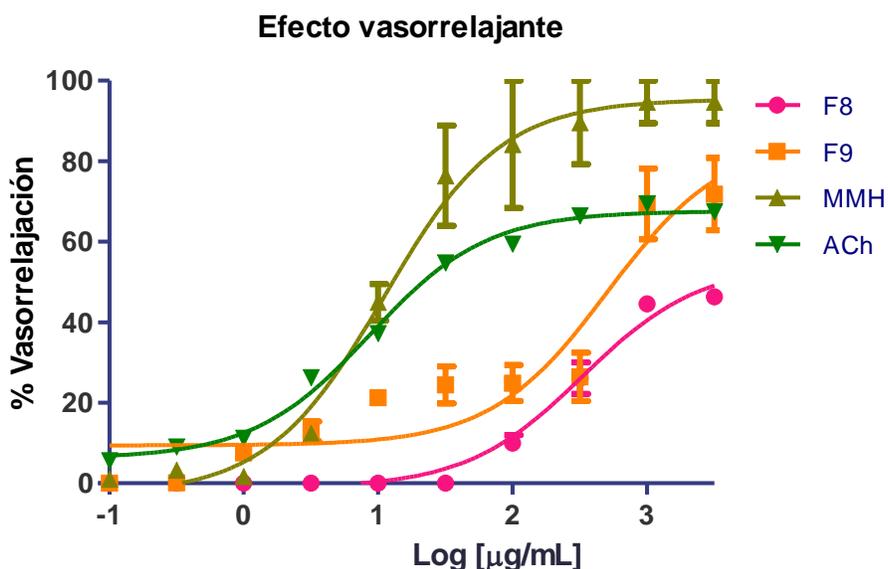


Figura 15. Curvas concentración-respuesta generadas por las fracciones F8 y F9.

Por otro lado, como se observa en la Figura 15, la fracción F9 presentó un porcentaje de relajación superior al de la fracción F8 en cualquier punto de concentración evaluada excepto en el que se alcanza el 50% de relajación. En este punto, se observa que la  $CE_{50}$  de la fracción F8 ( $316.30 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$ ) es

significativamente menor ( $p < 0.05$ ) a la de la fracción F9 ( $690.9 \pm 1.69 \mu\text{g/ml}$ ). Este resultado fue clave para elegir a la fracción F8 para la purificación de compuestos, ya que significó que esta fracción fue la más potente.

Como se observa en la Figura 15, ninguna de las fracciones obtenidas del extracto tuvieron un efecto similar al del extracto MMH, lo cual puede indicar un comportamiento sinérgico de los compuestos contenidos en este extracto, que son los que le confieren sus propiedades farmacológicas.

#### 7.6. Purificación de compuestos

Con los criterios antes señalados (ver punto 6.4.5), se seleccionó la fracción F8 para llevar a cabo la purificación de compuestos mediante CCFP. A continuación, se muestra una fotografía de una de las placas cromatográficas preparativas que se realizaron para la purificación de los compuestos donde se determinó el  $R_f$  de cada compuesto que fue aislado (Fig. 16).

El  $R_f$  del compuesto AB2 fue el que coincidió con el  $R_f$  del ácido ursólico; sin embargo esto no aseguró que se tratara de este compuesto.

También se muestran las placas uni y bidimensionales de las CCF realizadas para comprobar la homogeneidad de los compuestos aislados (Fig. 17). Se puede observar en estas placas que los compuestos presentaron algunas impurezas, a pesar de las cuales se decidió registrar los espectros de RMN de los compuestos aislados.

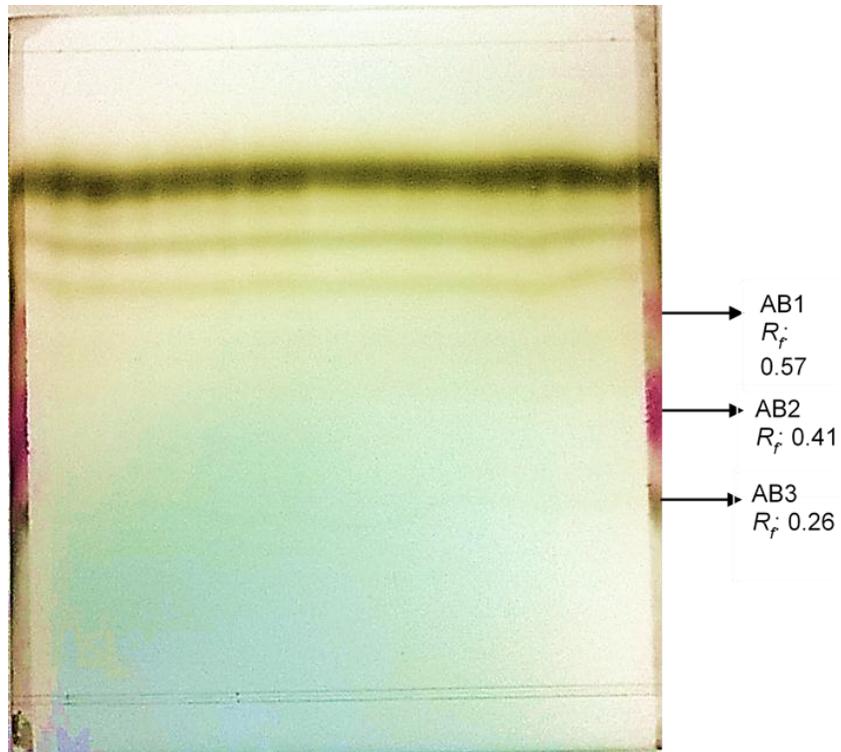


Figura 16. Perfil del cromatograma a nivel preparativo que permitió aislar algunos de los constituyentes de la fracción F8.

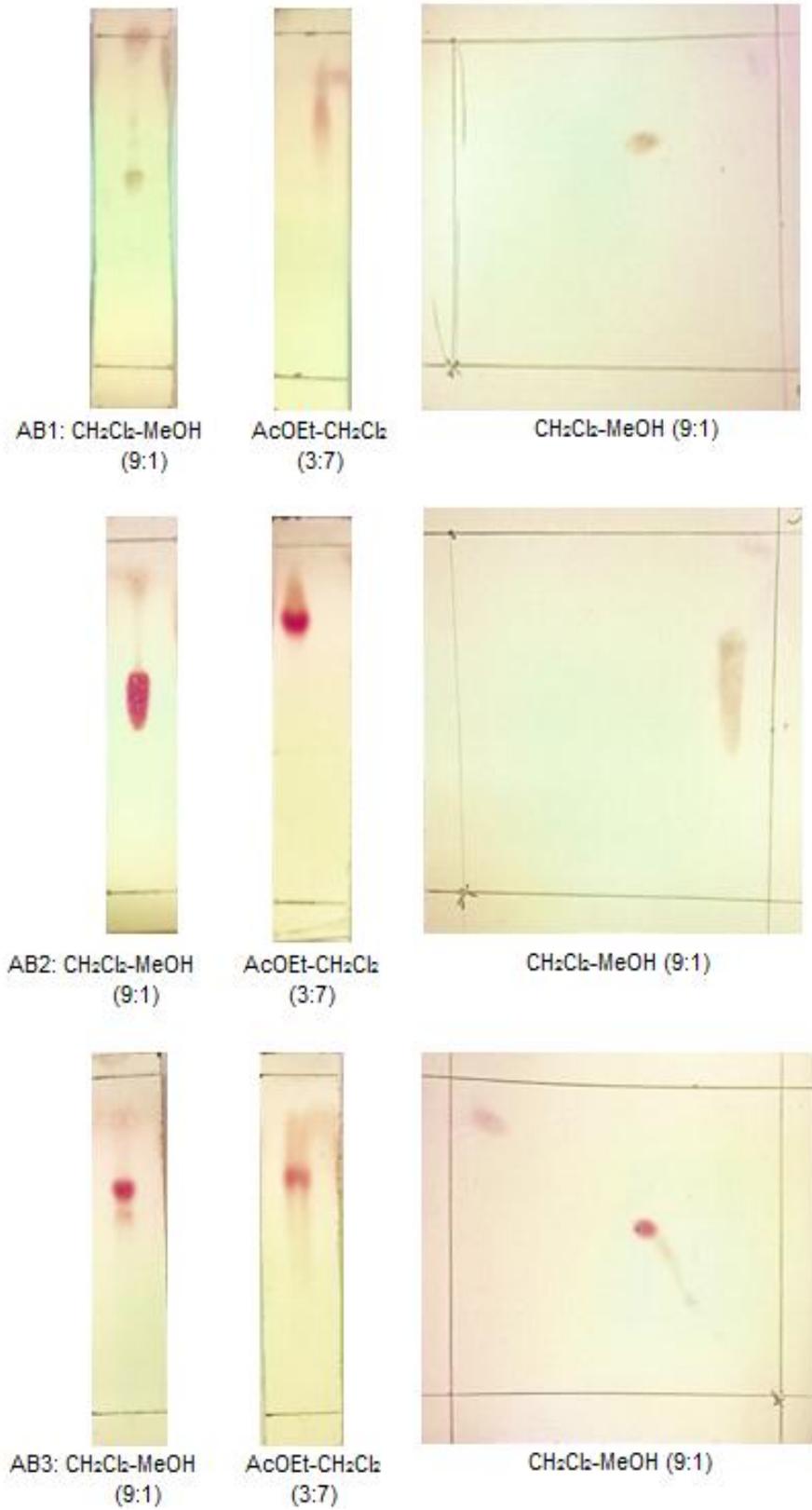


Figura 17. Análisis mediante CCF de la homogeneidad de las 3 bandas recuperadas de la CCFP de la fracción F8.

La deficiencia de homogeneidad de los compuestos aislados mediante CCFP puede explicarse, ya que a pesar de que se había encontrado un sistema de elución a nivel analítico que parecía ser adecuado para la purificación de los compuestos, éste no fue el más adecuado a nivel preparativo y aunque se hicieron algunas modificaciones no se encontró una resolución tan óptima como la obtenida a nivel analítico. Se puede observar en la parte revelada de la placa preparativa (Fig. 16), que las bandas correspondientes a los compuestos no se encuentran tan separadas. Además, cabe recordar que la elución de la placa no siempre ocurre de manera recta, sino que algunas veces ésta ocurre con una pequeña curvatura y esto hace aún más difícil el raspado de las bandas identificadas ya que éstas se pueden raspar junto con otros compuestos. Es además bien sabido que resulta muy difícil separar los componentes de esta familia de triterpenos muchas veces isoméricos.

#### 7.7. Identificación de compuestos purificados

El primer registro de los espectros de RMN de los tres compuestos se realizó en DMSO, confirmando la presencia de impurezas. En las Figuras 18 y 19 se ilustran como ejemplos los perfiles espectroscópicos de la muestra AB2. Este registro permitió determinar a grandes rasgos que todos los compuestos aislados presentaban un perfil característico de triterpenos pentacíclicos, ya que se observan en el espectro de  $^1\text{H}$  señales a campo alto correspondientes a metilenos y a metilos, contabilizándose por ejemplo claramente en los dos compuestos (AB2 y AB3) la presencia de 7 metilos. Además, en algunos espectros (como en el del compuesto AB2), se observa la señal ancha de un protón a campo bajo (12 ppm, aproximadamente) correspondiente a la señal de un protón de un ácido.

Por su parte, en el espectro de  $^{13}\text{C}$  se observa una señal a campo bajo (180 ppm, aproximadamente) correspondiente al carbono de un carbonilo como el presente en algunos triterpenos como el ácido ursólico. Otras señales distintivas son las del doble enlace característico de muchos triterpenos. Estas señales

aparecen entre 120 y 140 ppm, aproximadamente. También, se observan señales correspondientes a carbonos oxigenados que aparecen entre 70 y 80 ppm.

Una observación importante en todos los espectros, es que estos contienen, además de un compuesto mayoritario, algunas impurezas, las cuales se vieron también reflejadas en las placas de la CCF de estos compuestos. Estas impurezas dificultaron mucho, sobre todo en la región de los metilenos y metinos, completar la elucidación estructural a pesar de los espectros bidimensionales obtenidos. Por esta razón, se decidió llevar a cabo una purificación adicional, empleando en este caso la técnica de cambio de disolvente (del disolvente de registro de esos compuestos DMSO- $d_6$  a  $H_2O$ ), permitiendo que precipitaran los mayoritarios. A la fecha, sólo se ha completado este proceso para los compuestos AB2 y AB3, lo cual permitió registrar nuevamente sus espectros en  $C_5D_5N$  y completar su identificación, mediante la comparación de sus datos con los de la literatura (Seebacher *et al.*, 2003; Tzong-Huei *et al.*, 2005; Wei y Guangyuan, 2007).

De esta forma, AB2 fue identificado como el ácido ursólico y el AB3 como el ácido corosólico. Las Figuras 20, 21 y 22 se muestran los espectros del ácido ursólico y del ácido corosólico obtenidos en  $C_5D_5N$ .

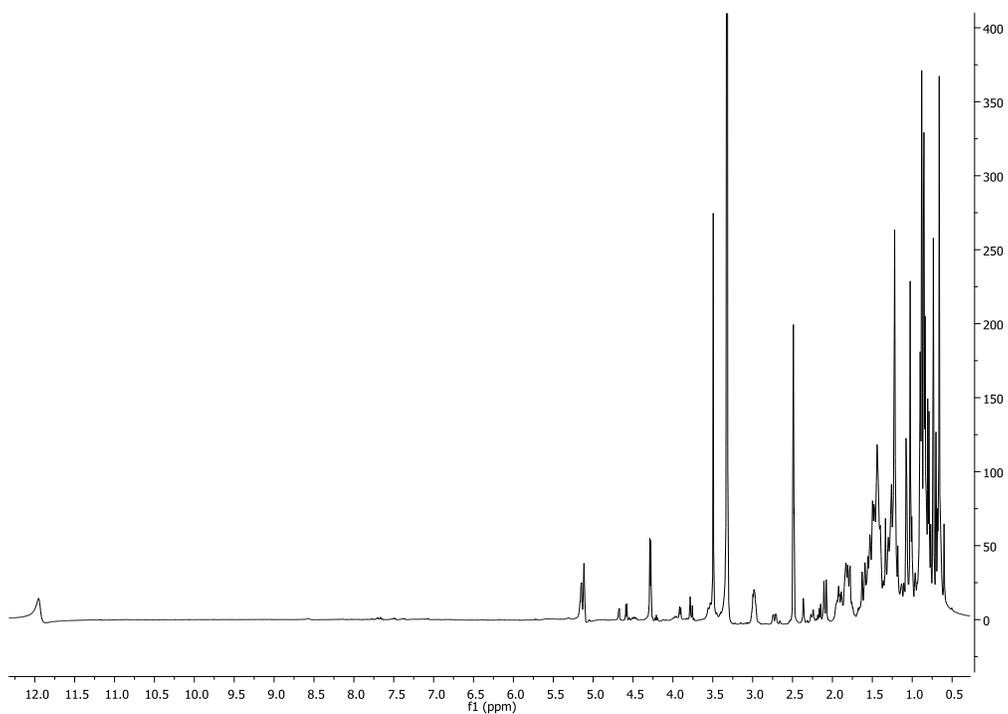


Figura 18. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) ( $\text{DMSO}-d_6$ ) del compuesto AB2.

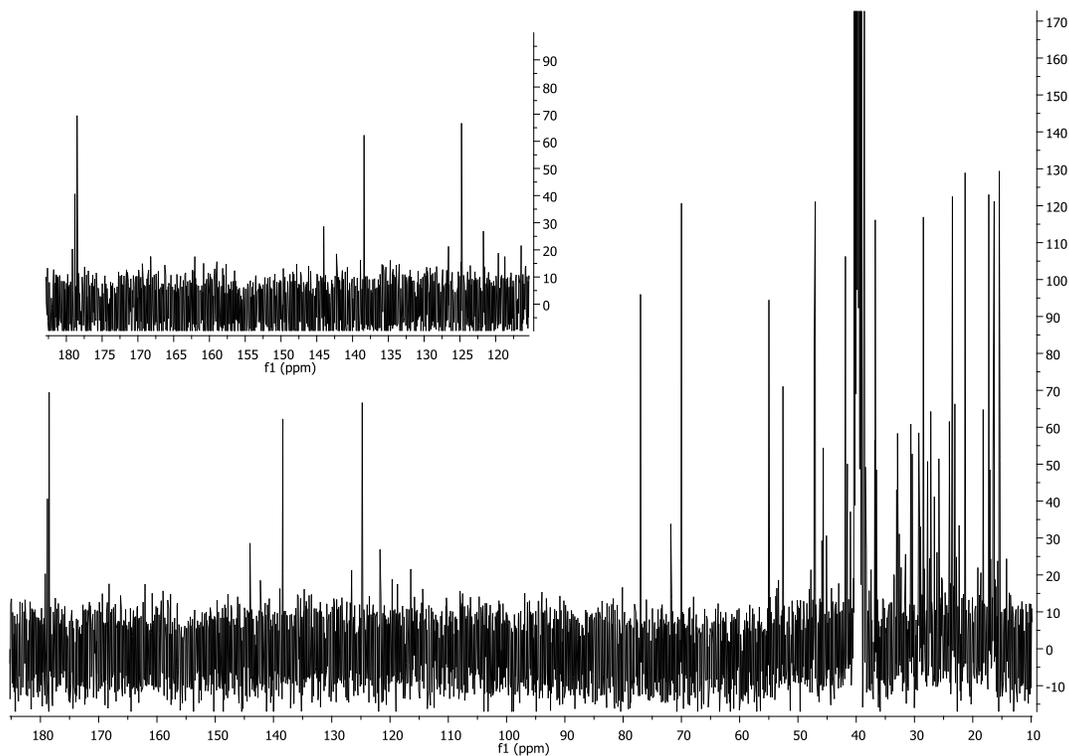


Figura 19. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) ( $\text{DMSO}-d_6$ ) del compuesto AB2.

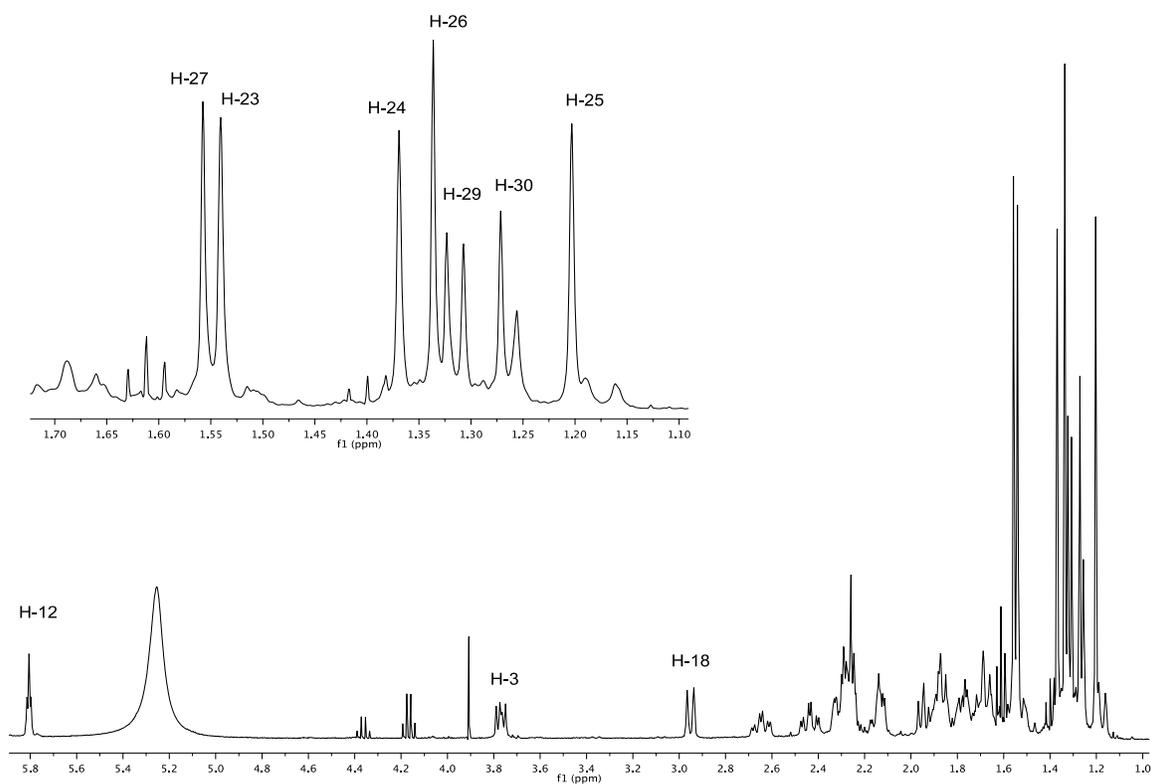


Figura 20. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto AB2 identificado como ácido ursólico.

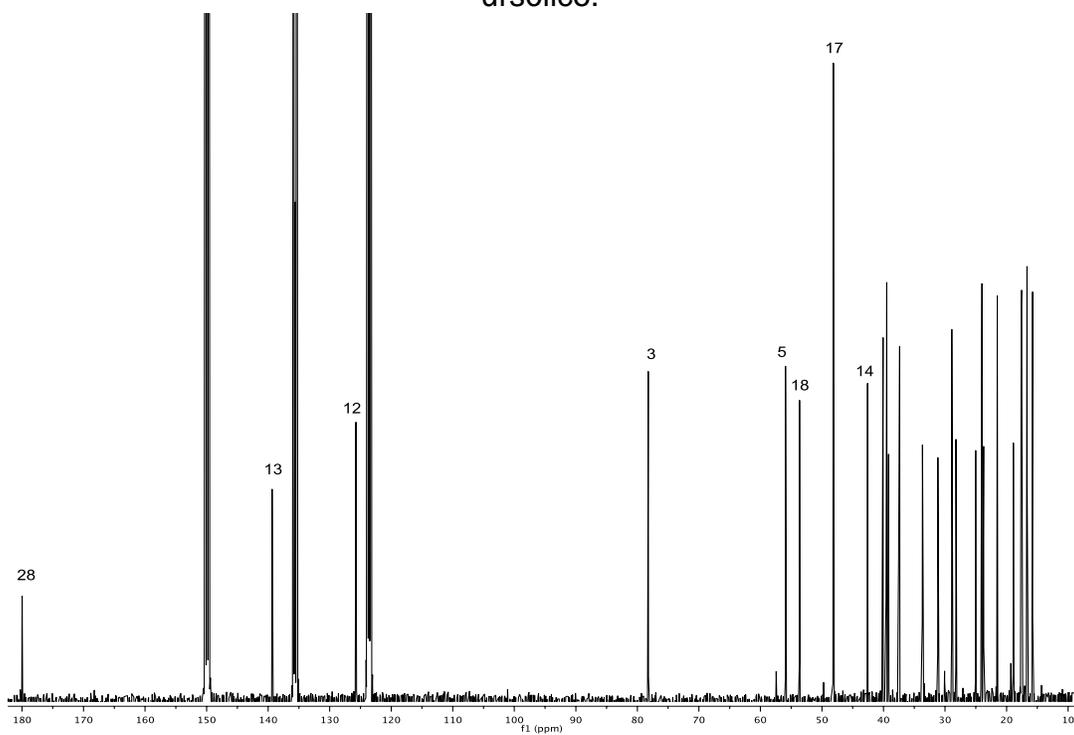


Figura 21. Espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto AB2 identificado como ácido ursólico.

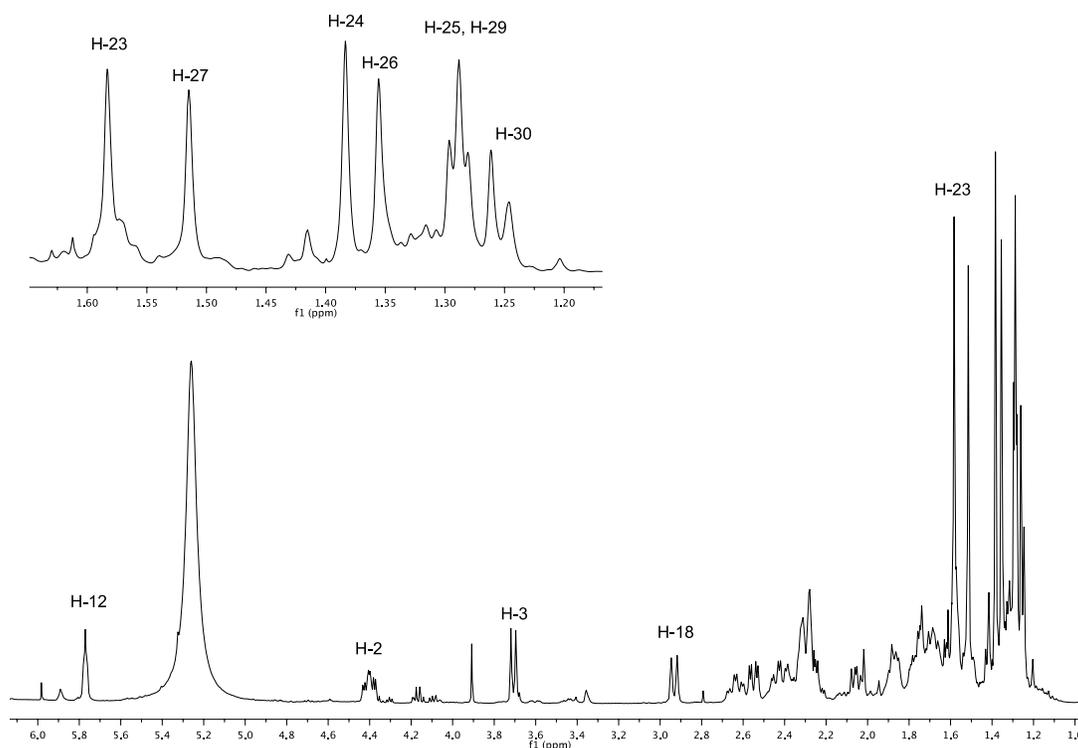


Figura 22. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto AB3 identificado como ácido corosólico.

A continuación, se muestran también los Cuadros 4 y 5, los cuales resumen algunas de las señales clave en esos compuestos. En tales cuadros, se reportan algunas de las  $J$  que se pudieron determinar.

Cuadro 4. Constantes espectroscópicas comparativas del compuesto AB2 ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $^1\text{H}$ : 400 MHz,  $\delta$  respecto a TMS,  $J$  en Hz) y datos de la literatura para el ácido ursólico (Seebacher *et al.*, 2003).

Posición	AB2		Ácido ursólico (Seebacher <i>et al.</i> , 2003)	
	$\delta\text{C}$ (ppm)	$\delta\text{H}$ (ppm); $J$ en Hz	$\delta\text{C}$ (ppm)	$\delta\text{H}$ (ppm); $J$ en Hz
3	78.2	3.77 dd; 6 y 10	78.2	$\alpha$ 3.44 dd; 5.2 y 9.5
5	55.9	-	55.9	$\alpha$ 0.88 d
12	125.7	5.81 t; 3.4	125.7	5.49 s

13	139.4	-	139.3	-
14	42.6	-	42.6	-
17	48.2	-	48.1	-
18	53.6	2.95 d; 11.6	53.6	2.63 d; 11.1
23	28.9	1.54 s	28.8	1.24 s
24	16.7	1.37 s	16.5	$\beta$ 1.02 s
25	15.8	1.20 s	15.7	$\beta$ 0.92 s
26	17.6	1.34 s	17.5	$\beta$ 1.06 s
27	24.0	1.56 s	24.0	$\alpha$ 1.24 s
28	180.0		179.7	-
29	17.6	1.32 d; 6.4	17.5	1.02 d; 5.9
30	21.5	1.26 d; 8.4	21.4	0.97 d; 6.8

t: triplete, d: doblete, s: singulete

Cuadro 5. Constantes espectroscópicas comparativas del compuesto AB3 ( $C_5D_5N$ ,  $^1H$ : 400 MHz,  $\delta$  respecto a TMS,  $J$  en Hz) y datos de la literatura para el ácido corosólico.

$^1H$	AB3	Ácido corosólico (Tzong-Huei <i>et al.</i> , 2005).	Ácido corosólico (Wei y Guangyuan, 2007).
2	4.09 td, 10.2, 4.2 Hz	4.11 ddd; 11, 9.5, 4	4.08 td, 11.0 Hz, 4.5 Hz
3	3.39 d, 9.2 Hz	3.43 d; 9.5	3.38 d, 9.5 Hz
12	5.45 t, 3.2 Hz	5.48 s	5.46 t, 3.5 Hz
18	2.62 d, 11.2 Hz	2.65 d; 11 Hz	2.61 d, 11.0 Hz
23	1.27 s	1.30 s	1.25 s
24	1.07 s	1.10 s	1.06 s
25	0.97	1.01 s	1.03 s
26	1.04s	1.07 s	0.94 s
27	1.20 s	1.23 s	1.20 s

28	COOH	COOH	COOH
29	0.97 d, 6.4	1.00 d; 6 Hz	1.01 d, 6.5 Hz
30	0.94 d, 6.0	0.97 d; 6 Hz	0.97 d, 6.5 Hz

t: triplete, d: doblete, s: singulete

## 8. CONCLUSIONES

- ❖ Todos los extractos preparados (polares y apolares) tuvieron actividad vasorrelajante. Sin embargo, los extractos polares fueron los más activos. Era lógico esperar ese resultado, ya que de manera tradicional, se consumen extractos polares generalmente acuosos e hidroalcohólicos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con vasorrelajación como la hipertensión arterial.
- ❖ La  $CE_{50}$  del extracto metanólico (MMH) fue similar a la de la acetilcolina utilizada como control positivo, pero al mismo tiempo el MMH tuvo una eficacia mayor.
- ❖ El extracto MMH, obtenido a partir de las hojas de *C. gracilior*, posee una eficacia y una  $CE_{50}$  similares a la del extracto WS1442®.

- ❖ Ninguna de las fracciones del extracto metanólico tuvo una actividad vasorrelajante comparable con la del extracto original MMH, lo cual puede sugerir una actividad sinérgica de los componentes químicos de este extracto.
- ❖ Aunque los extractos comerciales de *Crataegus* han sido estandarizados en base a compuestos fenólicos, los dos ácidos triterpénicos plenamente identificados en la fracción más potente pueden contribuir a la actividad farmacológica del extracto, debido a que se han comprobado sus efectos vasorrelajantes en estudios anteriores.
- ❖ Los estudios químicos alcanzados con este trabajo contribuyen de manera limitada al conocimiento del perfil químico, lo cual sugiere realizar un estudio más completo para caracterizar un mayor número de constituyentes individuales. Sin embargo, los resultados de la evaluación farmacológica soportan el uso tradicional de esta especie vegetal para tratar la hipertensión.

## 9. REFERENCIAS

Aguirre-Crespo F., Vergara-Galicia J., Villalobos-Molina R., López-Guerrero JJ., Navarrete-Vázquez G., Estrada-Soto S. (2006). Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity of *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.* 79:1062-1068.

Alqahtani A., Hamid K., Kam A., Wong KH., Abdelhak Z., Razmovski-Naumovski V., Chan K. (2013). The Pentacyclic Triterpenoids in Herbal Medicines and Their Pharmacological Activities in Diabetes and Diabetic Complications. *Curr Med Chem.* 20(7):908-31.

Arrieta J., Siles-Barrios D., García-Sánchez J., Reyes-Trejo B., Sánchez-Mendoza ME. (2010). Relaxant Effect of the Extracts of *Crataegus mexicana* on Guinea Pig Tracheal Smooth Muscle. *Pharmacognosy Journal.* 2(17):40-46.

Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Página web. Consultado 12/ago/13:<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7778>.

Babalola IT., Shode FO. (2013). Ubiquitous Ursolic Acid: A Potential Pentacyclic Triterpene Natural Product. *J Pharmacog and Phytochem.* 2(2):214-222.

Badimón L., Martínez-González J. (2002). Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos. *Revista Española sobre Cardiología.* 55(1):17–26.

Brixius K., Willms S., Napp A., Tossios P., Ladage D., Bloch W., Mehlhorn U., Schwinger RH. (2006). *Crataegus* special extract WS 1442 induces an endothelium-dependent, NO-mediated vasorelaxation via eNOS-phosphorylation at serine 1177. *Cardiovasc Drugs Ther.* 20(3):177-184.

Bubik MF., Willer EA., Bihari P., Jurgenliemk G., Ammer H., Krombach F., Zahler S., Vollmar AM., Furst R. (2012). A novel approach to prevent endothelial hyperpermeability: the *Crataegus* extract WS® 1442 targets the cAMP/Rap1 pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 52(1):196-205.

Cabrera LG. (1992). Diccionario de Aztequismos. 1ª ed. Ed. Colofón. México, D.F.166.

Chatterjee A., Catravas JD. (2008). Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular Pharmacology.* 49:134–140.

Corder R., Warburton RC., Khan NQ., Brown RE., Wood EG., Lees DM. (2004). The procyanidin-induced pseudo laminar shear stress response: a new concept for the reversal of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond).* 107(5):513-517.

Chang CL., Lin CS., Lai GH. (2012). Phytochemical characteristics, free radical scavenging activities, and neuroprotection of five medicinal plant extracts. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012:984295.

Chang Q., Zuo Z., Harrison F., Chow MS. (2002). Hawthorn. *J Clin Pharmacol.* 42:605-612.

Chinese Pharmacopoeia, China Pharmacopoeia Committee. (2005). Editorial Chemical Industry Press. Beijing. 25–26.

Croteau R., Kutchan TM., Lewis NM. (2000). Natural Products (Secondary Metabolism). In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Editorial American Society of Plant Physiologists. 1<sup>a</sup> ed. 1250-1268.

Dahmer S., Scott E. (2010). Health Effects of Hawthorn. *American family physician.* 81(4):465-468.

Dewick PM. (2002) *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. Ed. John Wiley & Sons LTD. 2<sup>a</sup> ed. University of Nottingham, UK. 168-202.

Edwards JE., Brown PN., Talent N., Dickinson TA., Shipley PR. (2012). A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry.* 79:5-26.

ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición). (2012). Evidencia para la política pública en salud. Hipertensión arterial en adultos mexicanos: importancia de mejorar el diagnóstico oportuno y el control.

Ganong WF. (2002). *Fisiología Médica: el manual moderno*. Editorial El Manual Moderno. 17<sup>a</sup> ed. México, D. F. 122, 657-661.

García-Mateos R., Aguilar-Santelises L., Soto-Hernandez M., Nieto-Angel R. (2013). Flavonoids and antioxidant activity of flowers of Mexican *Crataegus* spp. *Nat Prod Res.* 27:834-6.

Guyton AC., Hall JE. (2001). *Tratado de Fisiología Médica*. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. 10<sup>a</sup> ed. México D.F. 103-106.

Heller WT., Krueger JK., Trehella J. (2003). Further insights into calmodulin-myosin light chain kinase interaction from solution scattering and shape restoration. *Biochemistry*. 42:10579-10588.

Hernández-Pérez A. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación de compuestos fenólicos de frutos y hojas de *Crataegus mexicana* DC. Licenciado Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Autónoma de Querétaro.

Hobbs C., Foster S. (1990) Hawthorn: a literature review. *Herbal Gram*.22:19-33.

Ibarra-Alvarado C., García JA, Aguilar MB, Rojas A., Falcón A., Heimer de la Cotera EP. (2007). Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *J Comp Biochem Physiol*. 146(4):511-518.

Idris-Khodja N., Auger C., Koch E., Schini-Kerth VB. (2012). *Crataegus* special extract WS1442® prevents aging-related endothelial dysfunction. *Phytomedicine*. 19(8):699-706.

Khalil RA. (2010). Regulation of vascular smooth muscle function. In *Integrated systems physiology: from molecule to function*. Editorial Morgan & Claypool. 1<sup>a</sup> ed. 5-12.

Kim SH., Kang KW., Kim KW., Kim ND. (2000). Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sci*. 67: 121-131.

Kirakosyan A., Seymour E., Kaufman PB., Warber S., Bolling S., Chang SC. (2003). Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *J Agric Food Chem*. 51(14):3973-6.

Lahera V., De las Heras N., Cachofeiro V., López-Jaramillo P. (2010). Fisiología del endotelio y la pared vascular. In *Fisiología Humana*. Editorial Mc Graw Hill. 4<sup>a</sup> ed. México D.F. 555-563.

Lahera V., Cediell E., De las Heras N., Vázquez-Pérez S., Sanz-Rosa D., Vázquez-Cruz B., Cachofeiro V. (2003). Alteraciones del endotelio en la hipertensión. *Nefrología*. 12(4):3-11.

Li CQ., Wu W., Tong Y. (2007). Study on germicidal efficacy of extract of hawthorn fruit pit and its influencing factors. *Chin. J. Disinfect*. 24:50–52.

Liu P., Kallio H., Yang B. (2011). Phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus grayana*) fruits and leaves and changes during fruit ripening. *J Agric Food Chem*. 59(20):11141-9.

López-Corona G. (2013). Identificación y cuantificación del ácido clorogénico y de flavonoides presentes en hojas y frutos de *Crataegus gracilior* Phipps. Licenciado Químico Farmacéutico Biólogo Universidad Autónoma de Querétaro.

Loscalzo J., Libby P., Epstein J. (2004). Biología básica del aparato cardiovascular. In principios de Medicina Interna. Editorial Mc Graw Hill. 18ª ed. Boston Massachussets. 1798-1802.

Luna-Vázquez F. (2014). Purificación, elucidación estructural y caracterización del mecanismo de acción de compuestos vasodilatadores presentes en el fruto de *Prunus serotina* (Cav. ex Sreng) Mc Vaugh (Rosaceae) "capulin". Mtro. en Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana.

Luna-Vázquez FJ., Ibarra-Alvarado C, Rojas-Molina A, Rojas-Molina I., Zavala-Sánchez MA. (2013). Vasodilator Compounds Derived from Plants and Their Mechanisms of Action. *Molecules*. 18: 5814-5857.

Michel T., Hoffman BB. (2012). Tratamiento de la isquemia del miocardio y de la hipertensión arterial. In Bases Farmacológicas de la terapéutica. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 12ª ed. México D.F. 745-821.

Núñez-Colín CA., Nieto-Ángel R., Barrientos-Priego AF., Segura S., Sahagún-Castellanos J., González-Andrés F. (2008). Distribución y caracterización eco-

climática del género *Crataegus* L. (Rosaceae, SUBFAM. Maloideae) en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 14(2):177-184.

Núñez-Colín CA., Hernández-Martínez MA. (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.

Oelze M., Mollnau H., Hoffmann N., Warnoholtz A., Bodenschatz M., Smolenski A., Walter U., Skatckhov M., Meinertz T., Münzel T. (2000). Vasodilatador-smimulted phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of detective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res*. 87(11):999-1005.

OMS (Organización Mundial de la salud). (2013). Información general sobre la HIPERTENSIÓN en el mundo: Una enfermedad que mata en silencio, una crisis de salud pública mundial. Secc. 2:17-24.

Öztürk N., Tunçel M. (2011). Assessment of phenolic acid content and in vitro antiradical characteristics of hawthorn. *J Med Food*. 14(6):664-9.

Peters W., Druppel V., Kusche-Vihrog K., Schubert C., Oberleithner H. (2012). Nanomechanics and sodium permeability of endothelial surface layer modulated by hawthorn extract WS 1442. *PLoS One*. 7(1):e29972.

Phipps JB. 1997. Monographs of Northern Mexican *Crataegus* (Rosaceae, subfam. Maloideae). *SIDA Botanical Miscellany*. 15:1-94.

PAHO (Pan American Health Organization). (2008). Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. 15,16-19.

Rzedowski J., Calderon-de-Rzedowski G. (2005). Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Editorial INECOL Instituto de Ecología A.C. 1ª ed. Pátzcuaro, Michoacán, México. Fascículo 135:48-54.

Rieckeheer E., Schwinger RH., Bloch W., Brixius K. (2011). Hawthorn special extract WS1442® increases red blood cell NO-formation without altering red blood cell deformability. *Phytomedicine*. 19(1):20-24.

Rigelsky JM., Sweet B. V. (2002). Hawthorn: pharmacology and therapeutic uses. *Am J Health Syst Pharm*. 59:417-422.

Rosas M., Pastelín G., Vargas-Alarcón G., Martínez-Reding J., Lomelí C., Mendoza-González C., Lorenzo J., Méndez A., Franco M., Sánchez-Lozada L., Verdejo J., Sánchez N., Ruiz R., Férrez-Santander S., Attie F. (2008). Guías clínicas para la detección, prevención, diagnóstico y tratamiento de hipertensión arterial sistémica en México. *Archivos de Cardiología de México*. 78(2):5-57.

Sánchez-García A., Saiz J., Flórez J. (2008). Farmacología de la hipertensión arterial, la insuficiencia vascular periférica y la angiogénesis. In *Farmacología Humana*. Editorial Elsevier Masson. 5<sup>a</sup> ed. España. 771-790.

Schmitt CA., Dirsch VM. (2009). Review Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide*. 21:77–91.

Seebacher W., Simic N., Weis R., Saf R., Kunert, O. (2003). Complete assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR resonances of oleanolic acid, 18 $\alpha$ -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magn Reson Chem*. 41:636–638.

Sepúlveda-Jiménez G., Porta-Ducoing H., Rocha-Sosa M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3):355-363.

Soto-Zarazúa MG. (2013). Constituyentes químicos de las hojas de *Crataegus mexicana* DC. (Tejocote) (ROSACEAE). Licenciado Químico Farmacéutico Bioólogo. Universidad Autónoma de Querétaro.

Svedström U., Vuorela H., Kostianen R., Tuominen J., Kokkonen J., Rauha JP., Laakso I., Hiltunen R. (2002). Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers. *Phytochemistry*. 60:821-825.

Tzong-Huei L., Shin-Hun J., Feng-Lin H., Cheng-Yi W. (2005). Triterpene Acids from the Leaves of *Planchonella duclitan* (Blanco) Bakhuizen. *J Chi Chem Soc.* 52(6):1275-1280.

Verma SK., Jain V., Verma D., Khamesra R. (2007). *Crataegus oxyacantha* - A cardioprotective herb. *J Herb Med Toxicol Chemical.* 1(1) 65-71.

Wang J, Xiong X, Feng B. (2013). Effect of *Crataegus* usage in cardiovascular disease prevention: an evidence-based approach. *Evid Based Complement Alternat Med.* 149363.

Wei Z., Guangyuan Z. (2007). Corosolic acid isolation from the leaves of *Eriobotrta japonica* showing the effects on carbohydrate metabolism and differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Asia Pac J Clin Nutr.* 16(Suppl 1):346-352.

Yamaguchi Y., Yamada K., Yoshikawa N., Nakamura K., Haginaka J., Kunitomo M. (2006). Corosolic acid prevents oxidative stress, inflammation and hypertension in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sci.* 79: 2474–2479.

Yang B., Liu P. (2012). Composition and health effects of phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus* spp.) of different origins. *J Sci Food Agric.* 92(8):1578-1590.

Yuan YS., Rigor RR. (2010). Regulation of Endothelial Barrier Function. Editorial Morgan & Claypool Life Sciences. 1<sup>a</sup> ed. University of California Davis. 345-389.