

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA: QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

**“EFECTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y ORGÁNICO DE LAS HOJAS DE
Magnolia grandiflora, SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL DE RATAS HIPERTENSAS
POR COARTACIÓN DE LA AORTA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ROXANA GARCÍA MOLINA

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2005



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo lo dedico a lo más hermoso que me ofreció Dios, mi Familia.

Papá y Mamá gracias por su infinito apoyo, por enseñarme que a pesar de mis errores siempre contaré con uds. y por todo su amor.

Christian, Pedro e Ita por estar en todo momento a mi lado demostrando cariño y confianza.

A mis abuelos por haber dado luz a mi vida.

Al Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez” por haberme permitido realizar ésta tesis bajo el asesoramiento de la Dra. María Alicia Sánchez Mendoza, a quién agradezco infinitamente su tiempo y paciencia.

A mi Universidad y Profesores por formarme bajo la mejor enseñanza.

A mis Sinodales:

Q. Ma. Guadalupe Miranda Jimeno

Dra. María Alicia Sánchez Mendoza

Q. Carlos Salvador Valadez Sánchez

Q.F.I. Estela Valencia Plata

M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez

Por sus valiosos comentarios y su tiempo.

A mis amigos por ofrecerme su amistad incondicionalmente y por alentarme a salir adelante.

Y a ti por darle sentido a mi vida.

ÍNDICE

	página
RESUMEN.....	001
INTRODUCCIÓN.....	003
MARCO TEÓRICO.....	005
1. Presión arterial.....	005
1.1 Definición.....	005
1.2 Control de la presión arterial	006
1.2.1 Mecanismos en el sistema nervioso simpático.....	010
1.3 Métodos para medir la presión arterial	010
1.3.1 Métodos directos.....	010
1.3.2 Métodos indirectos.....	011
2. Hipertensión arterial	012
2.1 Definición	012
2.2 Clasificación según su etiología	013
2.2.1 Primaria.....	014
2.2.2 Secundaria.....	014
2.2.2.1 Enfermedades renales	014
2.2.2.2 Trastornos endócrinos.....	015
2.2.2.3 Coartación de la aorta	015
2.2.2.4 Defectos enzimáticos.....	016
2.2.2.5 Factores derivados del endotelio.....	016
2.2.2.5.1 Papel del óxido nítrico en los vasos sanguíneos...	018
2.2.2.6 Fármacos.....	019
2.2.2.7 Trastornos neurológicos.....	019
2.2.2.8 Trastornos neurógenos.....	019
3. Tratamiento farmacológico de la hipertensión.....	020

3.1	Diuréticos.....	021
3.2	Bloqueadores de los receptores α adrenérgicos.....	021
3.3	Bloqueadores de los receptores β adrenérgicos.....	022
3.4	Antagonistas de los receptores alfa y beta adrenérgicos.....	022
3.5	Bloqueadores de los canales de calcio.....	023
4.	Métodos no farmacológicos en el tratamiento de la hipertensión.....	023
5.	<i>Magnolia grandiflora</i>	024
5.1	Generalidades	025
5.2	Clasificación botánica.....	025
5.3	Distribución.....	026
5.4	Cultivo y hábitat.....	026
5.5	Usos.....	026
5.6	Componentes químicos.....	027
5.7	Farmacología.....	027
6.	Métodos analíticos	028
6.1	Métodos de extracción.....	028
6.1.1	Continuos.....	029
6.1.2	Discontinuos.....	030
6.2	Cromatografía	030
6.2.1	Definición.....	030
6.2.2	Clasificación de los métodos cromatográficos.....	031
6.2.2.1	Cromatografía plana.....	032
6.2.2.1.1	Cromatografía en capa fina.....	032
6.2.2.1.2	Cromatografía en papel.....	033
6.2.2.2	Cromatografía en columna.....	034
6.2.2.2.1	Cromatografía Líquido - sólido.....	034
6.2.2.2.2	Cromatografía de intercambio iónico.....	034
6.2.2.3	Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	035
6.3	Métodos de revelado.....	036
6.3.1	Físicos.....	036
6.3.2	Químicos.....	037

6.3.2.1 Técnica de bañado.....	037
6.3.2.2 Técnica de pulverizado.....	037
6.3.2.3 Técnica de vaporización.....	038
6.4 Espectrometría de infrarrojo.....	038
6.4.1 Generalidades y definición	038
6.4.2 Instrumentos de infrarrojo.....	039
6.4.3 Aplicaciones en análisis cualitativo.....	040
6.5 Espectrofotometría ultravioleta y visible.....	040
6.5.1 Generalidades	040
6.5.2 Instrumentos de absorción ultravioleta y visible.....	041
6.5.2.1 Instrumentos de doble haz.....	041
6.5.3 Aplicaciones en análisis cualitativo.....	042
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	043
OBJETIVOS	044
HIPÓTESIS	044
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	045
MATERIALES Y MÉTODOS	046
RESULTADOS	056
ANÁLISIS DE RESULTADOS	073
CONCLUSIONES	080
PROPUESTAS	081
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	082

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el efecto de los extractos acuoso y orgánico, obtenidos de las hojas de *Magnolia grandiflora*, sobre la presión arterial de ratas normo e hipertensas por coartación de la aorta, así como también la identificación de los principios activos presentes en los extractos antes mencionados.

Por medio de una extracción continua se obtuvieron los extractos acuoso y orgánico de las hojas de *Magnolia grandiflora*. Se llevaron a cabo análisis a la gota, estudio de espectroscopia de infrarrojo y de ultravioleta visible, cromatografía de capa fina y de líquidos de alta resolución, para identificar compuestos activos en los extractos.

El análisis a la gota y la cromatografía en capa fina con reveladores químicos selectivos demostró la presencia de grupos amino, cetonas, alcoholes, grupos heterocíclicos, esteroides, flavonoides, catequinas, amidas, xantinas, cafeína, iminas y purinas, entre otros. En el espectro de infrarrojo se evidenciaron bandas características de los grupos hidroxilo, carbonilo, imina, amina, éter y aromáticos. A través de la cromatografía de líquidos de alta resolución, fue posible establecer que el extracto analizado contiene cafeína y tiramina, según comparación con los tiempos de retención de los estándares correspondientes a cafeína y tiramina.

Se empleo la transformada de Fourier para la obtención de interferogramas satisfactorios y en consecuencia de espectros satisfactorios. Permaneciendo constantes la velocidad del espejo móvil, la verticalidad del espejo respecto a la trayectoria del haz a lo largo de todo el recorrido de 10 cm o más. La ventaja de ésta es su óptica la cual hizo posible la llegada al detector de una radiación de mayor potencia.

Los extractos se administran vía intravenosa a ratas normo e hipertensas por coartación aórtica, previamente anestesiadas con pentobarbital sódico. Se registró la presión arterial de las mismas con un polígrafo Grass 7D (Grass Instruments Co., Quincy Mass, USA). La administración del extracto crudo en ratas normo e hipertensas produjo una

disminución en la presión arterial que fue de magnitud semejante en ambos grupos experimentales. Con el extracto acuoso fracción I y con el extracto orgánico, se observó aumento en la presión arterial.

La disminución marcada de la presión arterial en ratas normo o hipertensas con la administración del extracto crudo, es debida posiblemente, al vulgarenol y 2-p-hidroxifenil-2-hidroxi-etilamina, magnograndiólido, entre otros, presentes en dicho extracto, dado el efecto vasodilatador que poseen.

El aumento de la presión arterial con la administración del extracto orgánico en ratas normotensas e hipertensas, es debida a la presencia de la tiramina y cafeína, las cuales producen vasoconstricción.

INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial es la enfermedad crónica esencial de mayor prevalencia mundial. En México en el año 2000, la prevalencia informada de la hipertensión arterial sistémica (HTAS), entre los 20 y 69 años, fue del 30.05%, es decir, más de 15 millones de mexicanos, en dicho grupo de edad. Los estados del norte de la república, alcanzaron cifras de prevalencia aún mayores. Lamentablemente, el 61% de los hipertensos detectados en la encuesta nacional 2000(1), desconocían ser portadores del mal. El costo de su atención en términos económicos es multimillonario, y en general, al tratarse de un padecimiento no curable, sino únicamente controlable, requieren generalmente de atención médica y tratamiento farmacológico de por vida (2).

Durante mucho tiempo los remedios naturales y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían las personas que las empleaban con fines curativos, esto hizo que se profundizará en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales, ampliando sus experiencias en el manejo de los productos que de ellas se extraen (3).

Muchas de las especies vegetales utilizadas entre los antiguos egipcios, griegos y romanos pasaron a formar parte de la farmacopea medieval, que más tarde se vio enriquecida por el aporte de los conocimientos del Nuevo Mundo. Dichas plantas medicinales y los remedios que entonces utilizaban se siguen empleando hoy en día (3).

A principio del siglo XX, el desarrollo de la química y el descubrimiento de complejos procesos de síntesis orgánica desembocaron en la puesta en marcha, por parte de la industria farmacéutica, de una nueva producción de medicamentos. Para la fabricación de muchos de ellos utilizaron los principios activos de determinadas plantas medicinales, creyendo que las acciones imputables a dichas sustancias, se incrementarían al poderse realizar terapias donde la cantidad de principio activo es superior a la que posee la planta (3).

En lo que respecta al estudio de las plantas cuyos principios activos actúan en el sistema cardiovascular podemos citar varios ejemplos:

A nivel de corazón

Cardiotónicas: Espino blanco (*Crataegus oxyacantha*), muérdago (*Viscum album*), árnica (*Arnica montana*), fenogreco o alholva (*Trigonella foenum-graecu L.*), gordolobo (*Verbascum thapsus*) (3).

Antiarrítmicas: Espino blanco (*Crataegus oxyacantha*), olivo (*Olea europaea*), muérdago (*Viscum album*), marrubio (*Marrubium vulgare*), fumaria (*Fumaria officinalis*), melisa (*Melissa officinalis L.*) (3).

Vasodilatadoras coronarias: Espino blanco (*Crataegus oxyacantha*), olivo (*Olea europaea*), muérdago (*Viscum album*), árnica (*Arnica montana*), ajo (*Allium sativum*), capuchina (*Tropaeolum majus*), fumaria (*Fumaria officinalis*), agrimonia (*Agrimonia eupatoria*), vincapervinca (*Vinca minor*), tila (*T. Grandifolia Ehr.*), zanahoria (*Daucus carota*), levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) (3).

A nivel de los vasos sanguíneos:

Hipotensores: Espino blanco (*Crataegus oxyacantha*), olivo (*Olea europaea*), muérdago (*Viscum album*), árnica (*Árnica Montana*), ajo (*Allium sativum*), agrimonia (*Agrimonia eupatoria*), grosellero negro (*Ribes nigrum*), achicoria (*Cichorium intibus*), fenogreco o alholva (*Trigonella foenum-graecu L.*), hisopo (*Hyssopus officinalis*), bolsa de pastor (*Capsella bursa-pastoris*), fumaría (*Fumaria officinalis*), tila (*T. Grandifolia Ehr.*), vincapervinca (*Vinca minor*) (3).

Hipertensores: Romero (*Rosmarinus officinalis*), regaliz (*Glycyrrhiza glabra L.*), tomillo (*Thymus vulgaris*), salvia hidratis (*Hydrastis canadensis L.*) (3).

Antiateromatosos: Alpiste (*Pallaris canariensis*), ajo (*Allium sativum*), muérdago (*Viscum album*), ortiga verde (*Urtica dioica L.*), alcachofera (*Cynara scolymus*), castaño de indias (*Aesculus hippocastanum*), ginseng (*Panax ginseng*), harpagofito (*Harpagophytum procumbens L.*) (3).

Tónico venoso y capilares: Bolsa de pastor (*Capsella bursa-pastoris*),

rusco (*Ruscus aculeatus*), castaño de indias (*Aesculus hippocastanum*), hidrastis (*Hydrastis canadensis* L.), hamamelis (*Hamamelis virginiani* L.), ginkgo biloba (*Ginkgo biloba*), grosellero negro (*Ribes nigrum*), vara de oro (*Solidago virga-aurea* L.) (3).

Tónicos cerebrales: Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba*), vincapervinca (*Vinca minor*), eleuterococo (*Eleuterococcus senticosus*), árnica (*Arnica montana*), ajo (*Allium sativum*) (3).

Antihemorrágicos: Alfalfa (*Medicago sativa*), cola de caballo (*Equisetum arvense* L.), vincapervinca (*Vinca minor*), ginkgo biloba (*Ginkgo biloba*), ortiga verde (*Urtica dioica* L.), hidrastis (*Hydrastis canadensis* L.), bolsa de pastor (*Capsella bursa-pastoris*), hipérico (*Hypericum perforatum*), castaño de indias (*Aesculus hippocastanum*), hamamelis (*Hamamelis virginiani* L.), arándano o mirtillo (*Vaccinium myrtillus*) (3).

MARCO TEÓRICO

1. PRESIÓN ARTERIAL

1.1 DEFINICIÓN

La presión arterial sistémica (PA), se define como la fuerza que soporta cada centímetro cuadrado de la pared arterial (presión = fuerza / área). Es un fenómeno fisiológico que está determinado primordialmente por el gasto cardíaco y las resistencias cardiovasculares sistémicas ($PA = GC \times RVS$), sus unidades de medida en el sistema CGS es el bar (dyn/cm^2), pero en la práctica, las presiones se miden en milímetros de mercurio (mmHg) o en centímetros de agua (cmH_2O). Es un fenómeno de reciente adquisición filogenética que requiere de un control orgánico muy complejo (4).

El gasto cardíaco se define como la cantidad de sangre que expulsa el corazón en un minuto y la resistencia cardiovascular sistémica como la dificultad que enfrenta el paso de la sangre por los vasos arteriales (5).

1.2 CONTROL DE LA PRESIÓN ARTERIAL

Existen varios factores que contribuyen, a diferentes niveles y tiempos, a la regulación de la presión arterial. Los mecanismos nerviosos, hormonales y hemodinámicos interactúan para lograr la regulación eficiente de la presión arterial al reaccionar a perturbaciones extrínsecas capaces de influir en la función cardiovascular. Algunos de ellos surgen en cuestión de segundos a minutos, en tanto que otros sistemas alcanzan su actividad máxima sólo después de horas o días (6-8). Los mecanismos reguladores a muy corto plazo (agudos) actúan modificando la resistencia vascular periférica, la capacitancia cardiovascular y la función o rendimiento cardíaco. Los mecanismos que regulan la presión arterial a largo plazo están íntimamente vinculados con la regulación del balance de sodio y el volumen del líquido extracelular (7, 9-11). Los excesos o déficit del volumen extracelular guardan íntima relación con el volumen sanguíneo y de este modo, son detectados por otros mecanismos de receptores cardiovasculares. Las señales son

transmitidas a los riñones que incitan alteraciones de la excreción de sodio y agua, así como de una corrección de los desequilibrios del volumen extracelular.

En la figura 1 se esquematiza de manera general las interacciones de varios mecanismos que intervienen en la regulación de la presión arterial

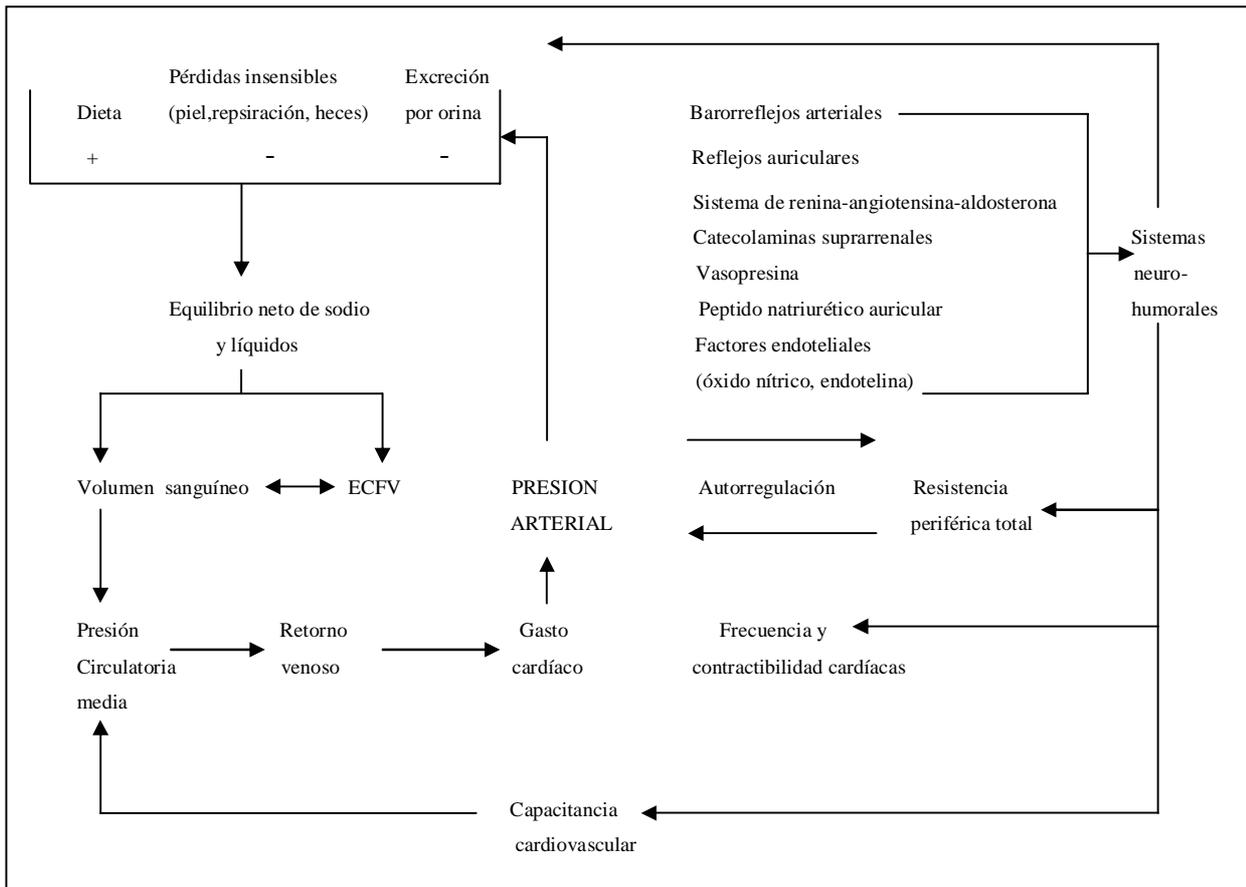


Figura 1. Mecanismos nerviosos, humorales y hemodinámicos que intervienen en la regulación de la presión arterial. Clave: ECFV = volumen extracelular (Tomado de Vari RC, Navar LG).

Se ha documentado ampliamente que la presión arterial se controla en múltiples niveles. Folkow y colaboradores (12) delinearon los tres niveles de control de la presión:

- 1) Nivel local
- 2) Nivel sistémico
- 3) Nivel central

En el primer nivel se ubica la regulación local. Aquí participan todos los lechos vasculares que regulan automáticamente el flujo que necesitan bajo un proceso denominado autorregulación. Debido a que la presión arterial es directamente proporcional al flujo sanguíneo, el control de éste, constituye un mecanismo regulador de la presión arterial. Existen dos teorías que tratan de explicar ésta regulación: una de ellas es la teoría miogénica, la cual establece que cuando la presión sube, los vasos sanguíneos se distienden y las fibras musculares lisas que los rodean se contraen. Esto se debe a la capacidad intrínseca del músculo liso para mantener constante el flujo sanguíneo. La teoría metabólica propone que la regulación se lleva a cabo, aumentando o disminuyendo las resistencias vasculares locales mediante la síntesis y liberación de sustancias vasoactivas de tipo dilatador o constrictor, esto en respuesta a los requerimientos metabólicos de los tejidos. Es decir, si el requerimiento es mayor, se llevará a cabo una vasorelajación que permite el aumento del flujo plasmático hacia el tejido. Los vasodilatadores que participan en la regulación del tono vascular son bradicinina (Bk), acetilcolina (ACh), adenosina (ADO), prostaglandinas (PGI₂ y PGE₂) y óxido nítrico (NO). Las sustancias vasoconstrictoras son compuestos tan diversos como la serotonina, angiotensina II (AngII), prostaglandinas (PGs) como el tromboxano A₂ (TXA₂) y los endoperóxidos (PGG₂), noradrenalina (NA), adrenalina y endotelinas (12).

El segundo nivel de modulación de la presión arterial es el sistémico, regido por los centros cardio y vasoactivo del bulbo raquídeo. El bulbo raquídeo recibe información proveniente de la periferia, a través de los receptores, y responde, según el estímulo, con la producción de neurotransmisores que modulan las respuestas vasculares. Los barorreceptores aórticos y carotídeos constituyen ejemplos típicos de receptores sensibles a los cambios de presión. Cuando hay disminución al estiramiento de los vasos sanguíneos, esos receptores envían su mensaje al bulbo raquídeo, que responde con una descarga brusca de noradrenalina que, a través de los receptores β_1 produce aumento de la frecuencia cardíaca y de la fuerza de contracción, lo que restaura los valores normales de presión arterial. Este es el mecanismo regulador que interviene más rápidamente (12).

Uno de los órganos que tiene un papel fundamental en el control de la presión arterial son los riñones. Guyton y colaboradores han descrito que existen dos determinantes de la presión arterial y son, por un lado, la ingesta de sal y agua, y por otro, la capacidad renal de eliminarlos. Además, los riñones también contribuyen al control fisiológico de la presión arterial a través del sistema renina-angiotensina-aldosterona (13).

Independientemente del control ejercido por el sistema nervioso y/o por la regulación hormonal, los riñones pueden ejercer un mecanismo de regulación de la presión arterial y del volumen sanguíneo, que es muy efectivo. Esto se fundamenta en la presión de diuresis, cuando la presión arterial sobrepasa los límites normales, la excreción de líquidos del riñón aumenta, y esto hace que disminuya el flujo circulante hasta que se alcancen los valores normales de presión arterial. La regulación se puede ejercer también en sentido opuesto, es decir, cuando la presión arterial disminuye, los riñones disminuyen su excreción urinaria y esto permite incrementar el volumen circulante hasta alcanzar nuevamente los valores normales de presión arterial. Este tipo de regulación es muy potente y contribuye al control de la presión arterial a largo plazo. La capacidad de regulación de la presión arterial, a través del balance hídrico por parte del riñón es tal, que se dice que tiene una ganancia infinita.

El nivel central del control de la presión arterial esta situado en el hipotálamo. La regulación que ejerce el hipotálamo es mediada fundamentalmente a través de la actividad autonómica y endócrina, así como a través de su interacción con el sistema límbico. La información externa que genera en el individuo reacciones de excitación, temor, cólera, etc., llega a la corteza cerebral a través de los sentidos, después al sistema límbico y finalmente al hipotálamo, que promueve las respuestas mediadas por el sistema autónomo y prepara al individuo para actuar. La estimulación eléctrica de la porción posterolateral produce respuestas mediadas por el sistema nervioso simpático, tales como, aumento de la presión arterial y de la frecuencia cardiaca, mientras que, la estimulación del hipotálamo anterior induce una respuesta parasimpática (12).

1.2.1 MECANISMOS EN EL SISTEMA NERVIOSO SIMPÁTICO

Desde hace decenios se ha planteado la participación capital del sistema nervioso simpático tanto en la regulación de la presión arterial como en la fisiopatología de la hipertensión (14-19). Los barorreceptores captan los cambios en la presión arterial y las señales que llegan al núcleo del fascículo solitario y a otros centros del tallo encefálico, modifican rápidamente el tono simpático que se manifiesta en el árbol cardiovascular.

Los incrementos en la actividad simpática influyen en el tono del músculo liso de los vasos, en la frecuencia cardiaca, en la médula suprarrenal (liberación de adrenalina) y en el riñón disminuyendo el flujo sanguíneo y la excreción de sodio (20,21). Además, los receptores de volumen a baja presión en el sistema venoso captan cambios de distensión y llenado de los vasos de capacitancia y modifican la actividad simpática y la excreción renal de agua y sodio (22).

Diversas investigaciones han indicado que las perturbaciones de tipo central en los mecanismos de control simpático son capaces de conservar un impulso hiperactivo que contribuye a mantener elevados los valores de presión arterial (16-19). Dicha capacidad del sistema simpático y de los mecanismos adrenérgicos para causar efectos sostenidos de la hipertensión se debe en parte a las interacciones de otros mecanismos humorales coexistentes y de sus efectos en los riñones (20, 23-26).

1.3 MÉTODOS PARA MEDIR LA PRESIÓN ARTERIAL

Los métodos de medición y monitoreo de la presión arterial han permitido realizar numerosos estudios que indican la existencia de una fuerte relación entre la elevación de la presión arterial (PA) y el incremento en la incidencia de la morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares. Para ello, existen métodos directos e indirectos (4).

1.3.1 MÉTODOS DIRECTOS

Se caracterizan por la introducción de un tubo de polietileno en la luz de un vaso arterial, habitualmente en la arteria radial o branquial, el cual, se conecta a un transductor

de presión que a través de una membrana altamente sensible a los cambios de presión convierte la señal mecánica en una eléctrica, enviándola a un sistema de amplificación y de registro (polígrafo) (4).

Punción Arterial. Es la técnica más antigua y más simple. Su uso es limitado, ya que por su carácter invasivo, requiere de restricción de las actividades físicas en el momento del registro, produciendo además estrés y daño a la arteria (4).

Cateterización Arterial. Después de la descripción de Still y colaboradores de la inserción arterial de una cánula en animales grandes, Popovic y Popovic, mencionaron una técnica de cateterización en la rata y en la ardilla; en la actualidad se dispone de modificaciones del procedimiento original que permiten la inserción de un tubo de polietileno dentro de la aorta a través de la arteria carótida. Un avance en el procedimiento se obtuvo con el uso del tubo de Silastic y la exteriorización de la cánula para la conexión de ésta a un transductor hidroneumático en el animal. Weekas y Jones insertaron el catéter a través de una aguja hipodérmica y usaron un catéter largo de polietileno para un mejor registro de la presión arterial. Muller y Mannesmann desarrollaron un método para medir simultáneamente el gasto cardiaco, la frecuencia cardiaca y la presión arterial. El catéter es conectado a un transductor y los registros se realizan utilizando un polígrafo. El cateterismo arterial se usa con éxito en humanos inconscientes, después de haber demostrado su eficiencia en los modelos experimentales con animales. La medición intraarterial de la PA se considera que es el método más exacto de registro de la presión sanguínea (4).

1.3.2 MÉTODOS INDIRECTOS

Todos los métodos indirectos usan un aparato que produce oclusión sobre una arteria (brazalete de Riva Rocci) y un equipo para la estimación de la PA (Ej. manómetro de mercurio). El principio estriba en determinar la presión que debe aplicarse a una arteria para hacer desaparecer el pulso más allá de la zona de la aplicación de la compresión (4).

2 HIPERTENSIÓN ARTERIAL

2.1 DEFINICIÓN

La hipertensión arterial sistémica se puede definir como la elevación de las cifras de presión sistólica, diastólica y/o media en el circuito mayor en forma sostenida, teniendo en cuenta el género, edad, raza, actividad y estado físico. Cuando la causa de esta enfermedad es desconocida se conoce como hipertensión arterial esencial o primaria, mientras que la hipertensión debida a factores tales como enfermedad renal, alteraciones endócrinas, defectos enzimáticos, trastornos neurológicos, coartación aórtica, entre otros, se considera como hipertensión arterial secundaria (27).

Cuanto más se incremente el nivel de la presión arterial, mayor será el riesgo de una enfermedad cardiovascular a largo plazo. El riesgo de enfermedad coronaria y vascular cerebral es dos veces mayor en adultos con una presión diastólica (PAD) arriba de 90 mmHg, en relación a los que tienen una presión diastólica menor de 80 mmHg (27).

La definición de la hipertensión generalmente se basa en la PAD, pero la presencia de elevaciones aisladas de la presión arterial sistólica (PAS) por encima de 160 mmHg, observada sobre todo en pacientes mayores de 65 años de edad, está asociada con un riesgo significativamente mayor, principalmente de accidente vascular cerebral (27).

El Joint National Committee VII, propuso la clasificación del grado de hipertensión según los niveles de presión arterial (2) Tabla 1 y Tabla 2:

TABLA 1. Valores de referencia para la presión arterial en el humano.

CATEGORÍA	PRESIÓN SISTÓLICA	PRESIÓN DIASTÓLICA
Nivel óptimo	< 120 mmHg	< 80 mmHg
Normal	120 a 129 mmHg	80 a 84 mmHg
Normal alta*	130 a 139 mmHg	85 a 89 mmHg
Hipertensión	140 o más mmHg	90 o más mmHg

*Si se trata de un paciente diabético con nefropatía (proteinuria) estas cifras deben ser consideradas como si fuera hipertensión y requiere tratamiento farmacológico.

TABLA 2. Estadíos de la Hipertensión Arterial

CATEGORÍA	SISTÓLICA	DIASTÓLICA
Estadío I	140 - 159 mmHg	90 - 99 mmHg
Estadío II	160 o más mmHg	100 o más mmHg

La hipertensión arterial es uno de los padecimientos crónicos más importantes del mundo; esto debido al número creciente de individuos con la afectación, al elevado número de incapacidades y muertes que produce y a la disminución de la calidad y de la esperanza de vida de quien la padece. Ha sido definida como un estado en el cual las presiones sistólica y/o diastólica exceden los valores normales de la presión arterial en forma sostenida, teniendo en cuenta sexo, edad, raza, actividad y estado físico. Como consecuencia, la hipertensión es la causa principal de paro cardíaco, produce enfermedad de las arterias coronarias con infarto al miocardio y muerte cardíaca repentina, contribuye a la falla cardíaca, insuficiencia renal y aneurisma de la aorta.

En el manejo de la hipertensión, el primer paso y el más importante, es una cuidadosa apreciación del nivel de la presión arterial, que se debe medir con frecuencia y de manera muy cuidadosa. Se sabe que la presión arterial varía mucho en forma natural, por lo que es importante eliminar todas aquellas causas controlables que podrían producir variación. Durante el registro ambulatorio de 24 h., la presión en estado de vigilia puede variar en más de 30 mmHg, los niveles más altos se encuentran en las primeras horas de la mañana y las lecturas más bajas por las tardes. Niveles aún más bajos son normalmente registrados durante el sueño, con la importante excepción de las elevadas lecturas que se registran durante los períodos de “apnea de sueño” (27).

2.2 CLASIFICACIÓN SEGÚN SU ETIOLOGÍA

La hipertensión arterial se ha clasificado con base a su etiología como primaria y secundaria.

2.2.1 PRIMARIA

Es aquella hipertensión cuyas causas no son identificadas, también conocida como hipertensión esencial.

2.2.2 SECUNDARIA

Es aquella hipertensión cuyas causas pueden ser debidas a numerosas entidades patológicas, entre las cuales las más importantes son:

2.2.2.1 ENFERMEDADES RENALES

La relación entre las enfermedades renales y la hipertensión es compleja debido a que una puede llevar a la otra, y no siempre resulta fácil determinar cuál es la primaria.

En la hipertensión renovascular se han identificado patologías que incrementan la presión arterial de manera sostenida y que pueden ser debidas a factores como la estenosis y constricciones o lesiones en la vasculatura de uno o ambos riñones. Cuando existe una disfunción en la perfusión renal y en la velocidad de filtración glomerular, la hipertensión resultante es mediada por una serie de mecanismos relacionados con la incapacidad renal de mantener una función de eliminación adecuada: aumento en la secreción de renina y retención renal de sodio. El daño de un riñón conduce al desarrollo y mantenimiento de la hipertensión arterial, por lo que se ha mencionado que debe existir una interacción patofisiológica intrarrenal, que influye sobre el riñón normal y mantiene la hipertensión (28).

En la glomerulonefritis aguda, la hipertensión arterial es transitoria y no suele ser severa. El mecanismo no está claro, pero la retención de sodio y agua puede tener un papel importante. La insuficiencia cardiaca se presenta aproximadamente en una cuarta parte de los casos, pero la hipertensión raras veces es un factor importante en su génesis (28).

La hipertensión severa es habitualmente una manifestación tardía de una nefritis crónica, y aparece tan sólo cuando existe insuficiencia renal grave. Puede aparecer hipertensión en más de la mitad de los casos con enfermedad poliquística congénita renal.

La hipertensión también puede estar producida por una enfermedad de la arteria renal, como consecuencia de un estrechamiento ateromatoso, una hiperplasia fibromuscular o la formación de un aneurisma (29).

2.2.2.2 TRANSTORNOS ENDÓCRINOS

La aldosterona es la principal hormona mineralocorticoide y se sintetiza en la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal. La síntesis es catalizada por la sintetasa de aldosterona a partir de la corticosterona.

La hipersecreción de aldosterona, debida ya sea a la presencia de un adenoma córtico-adrenal o a una hiperplasia multinodular de la zona glomerulosa, es reconocida como causa de hipertensión arterial. La causa fundamental del incremento en la presión arterial es el exceso en la secreción de aldosterona que conduce a un incremento en la reabsorción de sodio en los túbulos colectores, con el consecuente incremento en el volumen del fluido extracelular y un aumento en la eliminación urinaria de potasio. Las consecuencias de esto son el desarrollo de hipertensión y la supresión de los niveles plasmáticos de renina, ambos como resultado de la retención de sodio y expansión del volumen (29).

La presencia de feocromocitoma es otra causa de hipertensión. El feocromocitoma es un tumor de las células cromáfines que es capaz de sintetizar y secretar catecolaminas en grandes cantidades (29).

2.2.2.3 COARTACIÓN DE LA AORTA

La coartación aórtica puede definirse como un estrechamiento de la luz arterial de este vaso, habitualmente justo por debajo del origen de la arteria subclavia izquierda. De forma característica el grado de obstrucción es severo y se asocia a menudo a una válvula aórtica bicúspide que puede ser, o convertirse, en estenótica o permitir la regurgitación. El conducto arterioso puede persistir, en particular si la coartación es proximal a su inserción en la aorta (29).

La presión sistólica en la aorta y sus ramas proximales a la coartación es elevada, pero es posible que no se manifieste durante la infancia; la hipertensión diastólica es poco frecuente antes de la vida adulta y raramente grave en reposo. La hipertensión puede inducir cambios irreversibles en las arteriolas, de forma que la presión arterial puede no normalizarse incluso después de resear la coartación.

Sólo un pequeño volumen de sangre fluye a través del segmento estenosado; la mayor parte del suministro de sangre a la parte inferior del cuerpo se efectúa mediante

vasos colaterales que llegan a tener grandes dimensiones. La presión arterial en la mitad inferior del cuerpo es menor que la de la mitad superior, y la onda del pulso tarda más tiempo en llegar.

Experimentalmente, la coartación aórtica puede realizarse a nivel inter-renal lo cual produce la estenosis de un solo riñón, mientras que el otro riñón permanece en condiciones normales por cierto tiempo y puede progresar a la hipertrofia. La patofisiología en este modelo depende de la capacidad del riñón normal para regular el balance hídrico y electrolítico así como de su capacidad adaptativa al cambio en la producción hormonal, neural y de influencias hemodinámicas aportadas por el riñón isquémico. El riñón hipertrofico contribuye de manera importante al establecimiento de la hipertensión, al aumentar inapropiadamente la reabsorción de sodio (29).

2.2.2.4 DEFECTOS ENZIMÁTICOS

La deficiencia de diferentes enzimas puede conducir al desarrollo de hipertensión arterial, por ejemplo, la deficiencia de la 17α -hidroxilasa y de la 21-hidroxilasa producen disminución en la producción de cortisol, lo cual estimula la secreción de grandes cantidades de hormona adrenocorticotrófica (ACTH), que estimula a las glándulas suprarrenales para producir desoxicorticosterona y mineralocorticoides que favorecen el desarrollo de hipertensión e hipopotasemia. Otra enzima que puede conducir a hipertensión es la 11β -hidroxilasa, la deficiencia de ésta propicia el aumento del 11-desoxicortisol y la desoxicorticosterona en la sangre (30).

2.2.2.5 FACTORES DERIVADOS DEL ENDOTELIO

Las células del endotelio que reviste el interior de los vasos, participan en la regulación dinámica de la función vascular mediante la producción de diversas sustancias y también por constituir una barrera a la difusión de solutos e intercambio de líquidos (25, 26 31-34). Como se observa en la figura 2, los receptores de la membrana y las ectoenzimas propias de la membrana reaccionan a ligandos circulantes y señales físicas, como fuerzas de cizallamiento (shear stress), que activan los mecanismos vasodilatadores óxido nítrico (NO) y la prostaciclina (PGI_2) y vasoconstrictores como la endotelina (ET) y el tromboxano (TXA_2) (25).

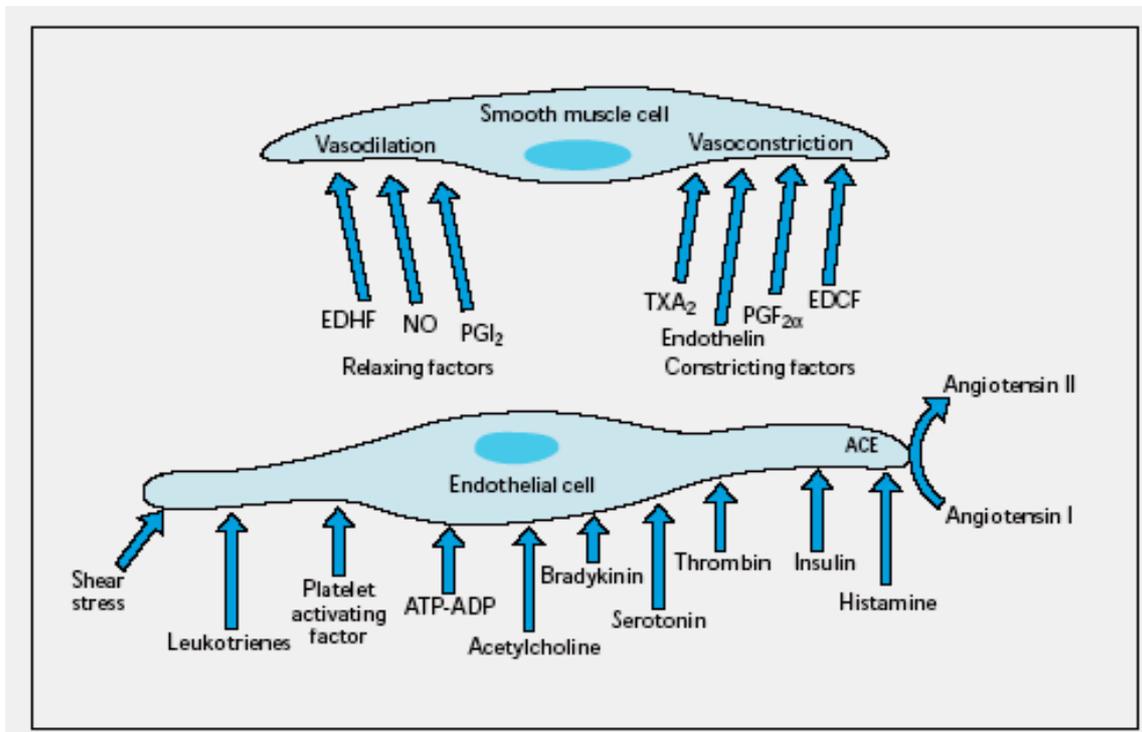


Figura 2. Esquema de las interacciones entre células endoteliales y las células del músculo liso de vasos. En respuesta a diversos estímulos, las células mencionadas liberan factores de relajación y de constricción en combinaciones diferentes, según las circunstancias fisiológicas y el estado fisiopatológico. PGI₂ = prostaciclina; PGF₂ = prostaglandina F_{2α}; TXA₂ = tromboxano A₂; ACE = enzima convertidora de angiotensina; ATP/ADP = adenosintrifosfato y adenosindifosfato; ANGII = angiotensina II; ANGI = angiotensina I; NO = óxido nítrico y EDHF = factor de hiperpolarización derivado del endotelio (Tomado de 11).

Alguna vez se concibió al endotelio como una capa interna de vasos sanguíneos que aportaba una superficie “no coagulante”, y que actuaba como una membrana semipermeable que permitía la difusión de macromoléculas. Sin embargo, desde 1980 en que Furchgott y Zawadzki (26) demostraron que las propiedades vasorrelajadoras de la acetilcolina dependían de la presencia de endotelio intacto y que dichos efectos se debían a la liberación de una sustancia humoral llamada factor relajante derivado de endotelio (EDRF), se acumularon innumerables pruebas que indicaban claramente que el endotelio por mecanismos endócrino, parácrino y autócrino regula el tono del músculo liso de vasos, la adherencia y la agregación plaquetaria, la coagulación local y el crecimiento vascular (31). En el control del tono vascular, el endotelio tiene una función doble, sus células

producen y liberan diversas sustancias vasoactivas que incluyen vasodilatadores, como óxido nítrico (NO), factor hiperpolarizante derivado de endotelio y prostaciclina, y además vasoconstrictores, como los factores derivados de ciclooxigenasa (el tromboxano A₂ y la prostaglandina F₂), endotelina y angiotensina II (producida de manera local o captada de la circulación) (31). La interacción de los vasodilatadores y los vasoconstrictores constituye un mecanismo de control local que regula el tono vascular. Es interesante destacar que en situaciones fisiológicas, el endotelio ejerce principalmente funciones inhibitoras; regula la contracción del músculo liso de los vasos, evita la agregación plaquetaria y retarda el crecimiento del músculo liso vascular (32).

2.2.2.5.1 EL PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LOS VASOS SANGUÍNEOS

El estudio del papel del óxido nítrico en los organismos inició en la década de 1980, con la identificación de un factor producido por el endotelio de los vasos sanguíneos, que provoca la relajación del músculo liso de sus paredes y ayuda a evitar que las plaquetas y los leucocitos se unan entre sí o a las paredes de los vasos. En un primer momento, la sustancia que producía tal efecto fue llamada factor relajante derivado del endotelio (EDRF), pero este nombre se suprimió cuando se descubrió su identidad como óxido nítrico (NO). El NO es uno de los factores más importantes que controlan la presión arterial. Se forma como un coproducto en la reacción de oxidación catalizada por la sintasa del óxido nítrico (NOS) cuando tiene por sustrato a la L-arginina (35-37). El NO es una sustancia difusible cuya vida media es de unos cuantos segundos. Los análogos de L-arginina, como el metil éster de nitro-L-arginina (L-NAME), bloquean eficazmente la síntesis de NO y con ello la vasodilatación que depende del endotelio. El mecanismo de acción vasodilatadora del NO comprende la estimulación de la guanilato ciclasa soluble y un incremento del monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) en células del músculo liso de vasos, lo que a su vez induce relajación (35-37). Si el endotelio no libera suficiente cantidad, los vasos sanguíneos se contraen, lo que incrementa la resistencia en la circulación periférica y como resultado, se eleva la presión arterial (29).

2.2.2.6 FÁRMACOS

La administración de fármacos de forma crónica, como los anticonceptivos orales, que contienen progestágenos y estrógenos, produce hipertensión en algunas mujeres, dicha hipertensión se debe, en parte, a un aumento en la concentración de angiotensinógeno circulante, producido por los estrógenos; éstos a su vez son capaces de producir edema, pero este efecto sólo se presenta en personas con factores predisponentes a la retención del fluido. Aunque se desconoce el mecanismo hipertensor de estos fármacos, se piensa que es debido a la retención de sodio y agua, secundaria al incremento en la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona y la formación subsiguiente de angiotensina. Weibenger y Weinstein en 1982 reportaron que el 5% de las pacientes que usan anticonceptivos orales presentan hipertensión moderada, que generalmente es reversible cuando se suspende el fármaco (29, 38-40).

El uso excesivo de desoxicorticosterona y de sales de los compuestos 5α -fluorados, en el tratamiento de la hipotensión postural, conduce al desarrollo de la hipertensión arterial (39, 40).

Fármacos como las anfetaminas y la tiroxina también producen estados hipertensivos, debido al aumento en la liberación de catecolaminas (38, 39).

2.2.2.7 TRASTORNOS NEUROLÓGICOS

La presencia de tumores cerebrales o accidentes cerebrovasculares incrementan la presión intracraneal, la cual precede a la hipertensión arterial. El encéfalo, las meninges, vasos sanguíneos y el líquido cefalorraquídeo se hallan contenidos en una caja rígida que, salvo en la niñez, no se dilata, por lo que todo tumor que ocupe espacio, trae como consecuencia un aumento en la presión intracraneal (38).

2.2.2.8 TRASTORNOS NEUROGÉNICOS, POSIBLEMENTE PSICOGÉNICOS

Los estados depresivos favorecen la presencia de hipertensión. En estudios clínicos ha sido demostrado que pacientes con depresión unipolar o bipolar presentan aumento de la presión arterial durante la fase depresiva (38). Esta relación depresión-hipertensión puede atribuirse a una disminución en la síntesis de noradrenalina, en el sistema nervioso central. En experimentos con animales, la administración de noradrenalina o α -agonistas en los

ventrículos cerebrales, disminuye la descarga simpática y la presión arterial.

El conocimiento de la etiología de la hipertensión arterial, ha permitido el desarrollo de medicamentos útiles en el tratamiento de la hipertensión arterial (tratamiento farmacológico) así como de la implementación de terapias no farmacológicas.

3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA HIPERTENSIÓN

La terapia farmacológica incluye el tratamiento del paciente con uno ó más fármacos antihipertensivos, que interfieren con los mecanismos que controlan el gasto cardíaco o la resistencia vascular. El número de fármacos disponibles en la actualidad es abundante y pueden agruparse en diferentes clases según su efecto farmacológico (**Tabla 3**).

TABLA 3: Principales fármacos empleados en el tratamiento de la hipertensión arterial.

DIURÉTICOS	BLOQUEADORES BETA
Clorotiazida Hidroclorotiazida Clortalidona Polítiazida Indapamida Xipamida Furosemida	Propranolol Metoprolol Sotalol Nadalol
INHIBIDORES DE LA ECA	ANTAGONISTA DE LOS CANALES DE Ca⁺⁺
Captopril Enalapril Ramipril Cilazapril Fosinopril Aquapril	Verapamilo Nifedepina Nicardipina Ditiazem Isradipina

3.1 DIURÉTICOS

Los diuréticos fueron los primeros fármacos que se introdujeron para el tratamiento de la hipertensión, actúan en los mecanismos que regulan la cantidad de sal en el organismo. Producen diuresis y aumento en la excreción de sodio (natriuresis) al prevenir la

resorción de sodio sobre todo en el túbulo contorneado distal. Esta diuresis ocurre durante los primeros dos o tres días de tratamiento (41), después los mecanismos homeostáticos entran en acción y el gasto de sal adquiere un balance entre ingestión y pérdida. Durante éste período corto de diuresis, el líquido extracelular total y el volumen plasmático se reducen de un 15 a 20 % (42) y permanecen en éste nivel conforme se continúe el uso de los diuréticos. En cuanto éstos se suspenden, el volumen se reexpande a los niveles pretratamiento. Al principio, la reducción de volumen causa una disminución en el gasto cardíaco, pero a esto, pronto le siguen mecanismos autorreguladores que provocan caída en la resistencia vascular y regresan el gasto cardiaco a lo normal. La reducción del volumen es la clave del efecto antihipertensivo de los diuréticos. Su mecanismo de acción no es compartido con alguna otra clase de antihipertensivos (42).

3.2 BLOQUEADORES DE LOS RECEPTORES α -ADRENÉRGICOS

Los antagonistas de receptores α -adrenérgicos, como la fentolamina y la fenoxibenzamina, no han sido útiles en el tratamiento de la hipertensión (exceptuando pacientes con feocromocitoma) la falla de éstos fármacos se debe fundamentalmente a sus efectos secundarios, en particular la taquicardia refleja, la retención de sodio y agua, lo cual causa resistencia al fármaco. El primer fármaco útil, de esta clase, para el tratamiento de la hipertensión fue el prazosín, el cual no produce taquicardia refleja, a partir de él se elaboraron fármacos con propiedades similares como el urapidilo, labetalol y la ketanserina.

Los efectos antihipertensivos de los bloqueadores α -adrenérgicos se deben al bloqueo del estímulo adrenérgico en las arteriolas periféricas. Al ocupar los sitios en los receptores adrenérgicos postsinápticos evitan que la estimulación simpática cause vasoconstricción (43).

3.3 BLOQUEADORES DE LOS RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS

Los bloqueadores de los receptores β -adrenérgicos actúan por antagonismo competitivo de los receptores β -adrenérgicos fundamentalmente en el corazón (44). Los bloqueadores β liposolubles, como el propanolol y el metoprolol, pueden cruzar la barrera hematoencefálica y se metabolizan en el hígado. Los bloqueadores β hidrosolubles, como el

atenolol, no son metabolizados y se eliminan sin cambios por la orina (45). Algunos bloqueadores β producen solamente bloqueo β_1 , en tanto que otros como el propranolol muestran una inhibición tanto β_1 como β_2 . Otras variedades producen bloqueo de los receptores α y β (labetalol) (46). Aún otros combinan un bloqueo β_1 con una estimulación simpaticomimética intrínseca, tal es el caso del pindolol (47). Todos actúan de manera fundamental por bloqueo beta.

Todos los bloqueadores β con excepción de aquellos con actividad simpaticomimética intrínseca reducen el gasto y la frecuencia cardíaca (44). La resistencia vascular periférica se puede incrementar inicialmente, pero después disminuye durante el tratamiento a largo plazo.

3.4 ANTAGONISTAS COMBINADOS DE LOS RECEPTORES α Y β ADRENÉRGICOS

Estos antagonistas como atenolol y carvedilol, son bloqueadores β que también tienen un efecto bloqueador de receptor α_1 (46). Estos fármacos reducen la presión arterial aproximadamente de un 10 a 20 % (46, 48). La caída en el gasto cardíaco es menor y la disminución en las resistencias periféricas totales es mayor con estas combinaciones de bloqueadores que con otros antagonistas β (48). Estas diferencias son mayores debido a la vasodilatación producida por el componente bloqueador α . Otra ventaja de la combinación de estos fármacos es que la actividad bloqueadora β previene la taquicardia refleja que a menudo se vincula con los vasodilatadores. Asimismo, el grado de bradicardia es menor con esta combinación de antagonistas α y β que con los bloqueadores β puros, y la respuesta en el gasto cardíaco durante el ejercicio se mejora con éstos bloqueadores combinados.

3.5 BLOQUEADORES DE LOS CANALES DE CALCIO

Los antagonistas de los canales de calcio inhiben el movimiento de los iones calcio del plasma de las células a través de canales. El calcio intracelular es esencial para la contracción del músculo liso vascular (49). Por tanto, el inhibir el flujo de calcio a través de la membrana celular provoca vasodilatación y una reducción en la resistencia vascular sistémica.

Los antagonistas de los canales de calcio varían considerablemente en sus efectos relativos sobre las arteriolas periféricas y el miocardio. El verapamilo y el diltiazem tienen un efecto inotrópico negativo significativo en el miocardio, disminuyen la frecuencia cardíaca y retrasan la conducción auriculoventricular. Por tanto, pueden llevar a insuficiencia cardíaca congestiva en pacientes con un trastorno de la función ventricular izquierda y a un bloqueo en individuos con alteración de la conducción auriculoventricular. También reducen la resistencia periférica y, por tanto, disminuyen la presión arterial. Deben considerarse para tratamiento inicial en hipertensos que también tienen angina de pecho, especialmente cuando los bloqueadores β no son eficaces o están contraindicados (50).

4. MÉTODOS NO FARMACOLÓGICOS EN EL TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL.

El uso de métodos alternos para el control y/o prevención de la hipertensión arterial se ha hecho más común en las últimas décadas. Medidas tales como la reducción de peso en sujetos obesos, restricción en el consumo de sodio, sustitución del consumo de grasas saturadas por insaturadas, consumo moderado de alcohol, ejercicios isotónicos y terapia de relajación son algunos de los procedimientos propuestos. Algunos de éstos métodos no farmacológicos pueden controlar la presión arterial sin el uso concomitante de antihipertensores, pueden reducir la frecuencia o reducir la dosis de éstos, mejorando la morbilidad y mortalidad cardiovascular (51).

El uso de plantas medicinales en el tratamiento de diferentes patologías es ancestral. Y el tratamiento de la hipertensión arterial no es ajeno a esta práctica. Una de las plantas que ha sido empleada con éste fin es la *Magnolia grandiflora*.

5. *Magnolia grandiflora*

La *Magnolia grandiflora* es una planta que ha sido empleada con diversos fines terapéuticos. La investigación farmacológica de esta tuvo cercana relación con la de la *Talauma mexicana*, popularmente conocida como “Yolloxóchitl” (flor del corazón), tanto por la cercanía taxonómica en la que se hallan las dos especies de la misma familia botánica (magnoliáceas), como por el hecho de que ambas han sido usadas ampliamente en la medicina tradicional mexicana con iguales propósitos cardiotónicos. Pérez Cirera y Roca publicaron sus resultados de haber administrado por vía intravenosa los extractos acuosos de hojas y flores de *Talauma* a animales. Ellos observaron vasoconstricción, hipertensión arterial y aumento en la fuerza de contracción (52, 53). Sin embargo, cuando utilizaron los extractos alcohólicos, notaron que los efectos producidos eran contrarios; es decir, se observaba hipotensión arterial y disminución o inhibición de la función cardíaca. Posteriormente se ha reportado que los extractos de las hojas de *Magnolia grandiflora* poseen acción hipotensora. Mellado y colaboradores (54) en 1980 administraron una infusión de flores de la magnolia a perros por vía oral e intravenosa y observaron un efecto cronotrópico negativo, acompañado de una fugaz pero intensa hipotensión arterial.



Figura 3. Foto representativa de la *M. grandiflora*.

5.1 GENERALIDADES

La *Magnolia grandiflora* fue tipificada por Linneo en 1759 (55). El género *Magnolia* fue otorgado en honor de Pierre Magnol, profesor de botánica en Montpellier entre los siglos XVII y XVIII (56).

5.2 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA SEGÚN ENGLER

Las Magnoliáceas pertenecen a la división de plantas angiospermas o plantas con flores (52,53). Comprenden 12 géneros y unas 230 especies.

Reino :	Vegetal
Sub-reino :	Embriophyta
División :	Tracheophyta
Subdivisión :	Pteropsidae
Clase :	Angiospermal
Subclase :	Dicotyledoneae
Orden :	Ranales
Suborden :	Magnoliales
Familia :	Magnoliaceae
Género :	<i>Magnolia</i>
Especie :	<i>grandiflora</i>

Son árboles de más de 30 metros de altura, el tronco es vertical o curvado, con corona regular o piramidal, su ramaje es numeroso y torcido. Sus hojas están alternas, dispuestas en manojos terminales, de 10 a 20 cm de longitud y unos 7 a 10 cm de anchura. Son elípticas u oblongo-ovadas, con la punta aguda y la base cuneada, coriácea, de color verde brillante en el haz y furrugíneo-pubescentes en el envés. Las flores se encuentran situadas sobre pedicelos tomentosos, erguidas, solitarias, de gran tamaño, de hasta 20 cm de diámetro. Poseen de 6 a 12 pétalos estrechados en la base, de color blanco, y 3 sépalos de aspecto petaloide. El fruto tiene forma de piña ovalada de unos 10 cm de longitud. Las semillas son aplanadas, de color rojo, de aproximadamente 1.0 a 1.3 cm de longitud, sujetas al folículo por un funículo filiforme. El fruto realmente es un conjunto de folículos agrupados en una estructura leñosa (57-58).

5.3 DISTRIBUCIÓN

La *Magnolia grandiflora* es un árbol nativo de las regiones del centro y sur de Georgia, del sur de Carolina, Alabama, Lousiana y los distritos del norte de Florida, y es conocido como uno de los árboles de hojas perennes más grandes y anchas. También esta distribuida en el sur de Virginia, al este de Texas y se extiende al Caribe según Howard, 1948. En México se cultiva en el estado de Veracruz, en el Jardín Central de Naolínco, Hernández. En el Valle de México en el Hospital de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”, Tlalpan, D.F.

5.4 CULTIVO Y HÁBITAT

Para el cultivo de la *Magnolia* en Europa, son propagadas las semillas por métodos de injercción (57, 58). Posteriormente son puestas abajo con todo y vaso contenedor de las raíces, tomando 2 años para su crecimiento.

Las magnolias se desarrollan mejor en tierras ricas, moderadamente húmedas y porosas, preferentemente en arenas o tierras arcillosas, sin embargo, algunas como la *M. glauca* crecen de manera natural en bordes pantanosos, la cual se encuentra altitudinalmente desde 1000 hasta 1800 m sobre el nivel del mar, esta especie es originaria de Carolina septentrional.

En el interior de la República Mexicana encontramos a la *M. grandiflora* en los estados de Puebla, Colima, Chiapas y en el Distrito Federal (56).

5.5 USOS

El tejido leñoso es valuado para acabados de muebles, tales como armarios o cajones (56). La *Magnolia* en México es altamente ornamental y popular, por ende es muy utilizada en jardines y casas.

Investigaciones histórico-botánicas realizadas en México (57, 58) refieren, desde tiempos prehispánicos, que las magnoliáceas, fueron utilizadas para el tratamiento de padecimientos cardíacos que se acompañaban de palpitaciones y problemas respiratorios. Las culturas Maya, Azteca y Tolteca elaboraban infusiones de hojas, flores y corteza de *Talauma mexicana* y *Persea americana* entre otras magnoliáceas como la *grandiflora* (ésta última introducida en América por los españoles en tiempos de la Colonia) (58), ya sea

ingeridas o en apósitos, para aliviar los problemas cardíacos, práctica que se lleva a cabo hasta hoy en día.

Los chinos la emplearon como sedativo o analgésico. En Japón es tomada para la distensión abdominal o dolor, y como diurético. Se usa para dolores de cabeza y vértigo.

5.6 COMPONENTES QUÍMICOS

De la *Magnolia grandiflora* se han aislado tiramina (Matsutani 1975)(59), magnolidina, magnolenina, magnosidina, candicina, magnoflorina (Rao 1975)(60), verlotorina, custonólido, santamarine, reynosin, partenólido (Weidhopf 1973)(61), magnolol, honokiol (Fujita 1973)(62), acantósido B, syringina, mono-*o*-metilhonokiol (Rao 1982)(63), magnolialida y gliceril monopalmitato (E.I. Feraly 1978)(64).

Recientemente un estudio realizado en el Instituto Nacional de Cardiología señala que en los extractos de *Magnolia grandiflora* están presentes vulgarenol y 2-*p*-hidroxifenil-2-hidroxi-etilamina (56).

5.7 FARMACOLOGÍA

Solamente algunos de los compuestos arriba mencionados han sido ensayados farmacológicamente, encontrándose que pueden originar disminución variable del tono vascular en tráquea, vejiga e intestino en especies tales como cobayo, rata y conejo, mientras que en la musculatura vascular aórtica, el efecto de relajación no es evidente, a diferencia del músculo liso vascular coronario (54, 66-68).

Así mismo, el vulgarenol y 2-*p*-hidroxifenil-2-hidroxi-etilamina, presentan un efecto vasodilatador e inotrópico positivo sobre el músculo cardíaco de cobayo (56).

Los extractos de hojas de *Magnolia grandiflora* poseen marcada acción hipotensora; los alcaloides magnolia y magnolamina (compuestos benzilisoquinolínicos) producen inhibición del centro vasomotor y un efecto periférico de tipo adrenolítico. La *Magnolia* aparece además como un inhibidor de la colinesterasa; la magnolamina es cinco veces más activa como hipotensor que la magnolina (Turova 1974, Petkov 1979). En la medicina popular de otros países, esta planta se utiliza para producir dilatación de los vasos sanguíneos.

En los extractos de hojas de *Magnolia grandiflora* se detectó actividad citotóxica, al ser ensayados en estudios de rastreo anticancerígeno *in vitro* (Weidhopf 1973) (61), atribuyéndole la actividad tóxica al partenólido.

Mellado y colaboradores en 1980 (54), realizaron estudios farmacológicos con la infusión de las flores de *Magnolia grandiflora*, administrándola por vía oral e intravenosa en perros y sobre el tejido auricular, *in vitro*, de diversas especies de animales. En tales estudios, se reporta el efecto cronotrópico negativo observado en el corazón del perro, acompañado de una fugaz pero intensa hipotensión arterial cuando el producto se administra por vía intravenosa. Los estudios en aurícula demostraron que la infusión de flores de ésta planta posee acción cronotrópica e inotrópica positiva y les permitieron concluir que dichos extractos ejercen su acción básicamente sobre el corazón. En experimentos realizados por Lozoya, 1980 (69) se compararon los efectos producidos por la infusión del yolloxóchitl y de las flores de *Magnolia* sobre la aurícula aislada de la rata, observándose diferencias importantes entre los dos extractos; mientras que la *M. grandiflora* indujo efectos semejantes a los de un glucósido cardíaco, la *Talauma mexicana* produjo una reacción de tipo aminérgico al contraer los vasos sanguíneos y producir aumento notable de la frecuencia de contracción.

6 MÉTODOS ANALÍTICOS

6.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Antes de llevar a cabo la extracción en plantas, es necesario realizar primeramente la colecta del material, ya sean hojas, flores, etc. Posterior a ella, llevar a cabo la limpieza de las mismas empleando agua, sulfato de zinc, entre otros, para evitar su deterioro y por último preservar el material seco.

Es importante reducir el tamaño de partícula de la muestra en cualquier extracción, para que la superficie de contacto entre el disolvente y la misma sea mayor y con ello obtener mayor rendimiento (70).

En el área de productos naturales, los métodos de extracción se clasifican en (70):

MÉTODOS CONTINUOS	MÉTODOS DISCONTINUOS
Extracción con Soxhlet Arrastre de vapor Extracción con fluidos supercríticos	Maceración Percolación Infusión Decocción

6.1.1 MÉTODOS CONTINUOS

Extracción con Soxhlet. Es el método más empleado para la extracción de productos de plantas naturales. Esta técnica usa la extracción continua por disolventes de polaridad incrementada. La muestra es colocada en un equipo Soxhlet, mediante el cual un disolvente es calentado a reflujo continuamente. Es el mejor método de extracción para obtener grandes cantidades de producto del extracto.

Arrastre de vapor. La muestra es colocada en un matraz redondo que contiene un

disolvente y la mezcla es calentada a reflujo. Típicamente el material es “cocido” usando disolventes como el etanol o una mezcla de etanol-agua. La técnica es conocida también como “extracción total” y tiene la ventaja, de que el etanol extrae la mayoría de los compuestos lipofílicos y polares.

Extracción con fluidos supercríticos. Este método aprovecha el hecho de que algunos gases se comportan como líquidos cuando están bajo presión y tienen propiedades de disolventes. El ejemplo más importante es el dióxido de carbono (CO₂) que puede ser usado para extraer productos, teniendo la ventaja de que una vez que la presión ha sido removida, el gas caliente se evapora dejando un extracto limpio. El CO₂ es un disolvente no polar pero la polaridad del disolvente de extracción del fluido supercrítico puede incrementarse por la adición de un agente modificante (metanol o diclorometano).

6.1.2 MÉTODOS DISCONTINUOS

Maceración. La extracción se realiza colocando la muestra en un recipiente y posteriormente se agrega el disolvente de extracción hasta cubrir totalmente el material, generalmente se realiza a temperatura ambiente.

Percolación. En ésta técnica el material se coloca sobre una gasa contenida en un embudo y se le hacen pasar porciones del disolvente de extracción a una temperatura menor de su punto de ebullición.

Infusión. Este método de extracción emplea disolvente de extracción caliente, al cual se le agrega la muestra y se deja reposar.

Decocción. La técnica emplea el disolvente cuando ésta en ebullición y posteriormente se le agrega la muestra y se prosigue con el calentamiento (70).

6.2 CROMATOGRAFÍA

6.2.1 DEFINICIÓN

La cromatografía puede definirse como una técnica que separa una mezcla de solutos basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por una fase móvil (líquida o gaseosa) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida.

Los comienzos de la cromatografía se sitúan a principios de siglo XX cuando Tswett, botánico ruso, empleo la técnica para separar varios pigmentos vegetales, tales como clorofilas y xantofilas, haciendo pasar disoluciones de éstos compuestos a través de una columna de vidrio rellena con carbonato de calcio finamente dividido. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas en la columna, lo que justifica el nombre que eligió para el método (del griego **chroma** que significa “color”, y graphein que significa “escribir”). No obstante, no existen datos sobre la utilización de ésta técnica hasta 1930 cuando Jun y Lederer separaron también pigmentos de plantas usando como adsorbentes alúmina y carbonato cálcico. A partir de ésta fecha se inició el verdadero desarrollo de la cromatografía (71).

Por lo tanto, es un método fisicoquímico que permite separar los componentes de una mezcla de solutos por distribución en dos fases, una de las cuales es móvil y la otra estacionaria. Pudiendo servir como fase estacionaria un sólido o un líquido, éste último debe estar inmóvil sobre un soporte inerte. La fase móvil puede ser un líquido o un gas. Dependiendo de la naturaleza de las fases utilizadas, la cromatografía puede clasificarse en varios tipos: sólido-líquido, líquido-líquido, gas-sólido y gas-líquido; por esta diversidad la cromatografía en las últimas décadas ha adquirido un gran valor, ya que su empleo ha contribuido no sólo a la identificación, sino también al aislamiento de compuestos químicos o de origen biológicos, aún en cantidades muy pequeñas. Dichos compuestos generalmente poseen propiedades físicas y químicas muy semejantes, siendo muy difícil por otras técnicas conseguir tales resultados.

6.2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

- 1) Forma en que las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto:

CROMATOGRAFÍA PLANA	CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA
Cromatografía en capa delgada (adsorción)	Cromatografía líquido-sólido (adsorción)
Cromatografía en papel (partición)	Cromatografía líquido-sólido (partición) Cromatografía de intercambio iónico

2) Tipo de fase móvil y estacionaria:

CROMATOGRAFÍA DE GASES	CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS	CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS
Cromatografía gas-líquido (partición)	Cromatografía líquido-líquido (reparto)	Fase móvil: fluido supercrítico
Cromatografía gas-sólido (adsorción)	Cromatografía líquido-sólido (adsorción)	
	Cromatografía de intercambio iónico	
	Cromatografía de exclusión	

6.2.2.1 CROMATOGRAFÍA PLANA

La cromatografía plana es un tipo de cromatografía líquida en la que la fase estacionaria está extendida sobre la superficie de un plano y la fase móvil fluye a través de ella. La fase móvil siempre es un líquido, mientras la fase estacionaria puede ser un líquido soportado en un sólido (cromatografía de partición) o un sólido adsorbente (cromatografía de adsorción, cambio iónico o exclusión). El flujo de la fase móvil se produce:

- a) por capilaridad (cromatografía horizontal y ascendente)
- b) por capilaridad o gravedad (cromatografía descendente).

En la cromatografía plana, la disolución de la muestra a separar se sitúa sobre el plano que contiene la fase estacionaria en forma de mancha, o a veces de banda, a corta distancia de uno de los extremos de dicho plano. Una vez seca la mancha o banda, el extremo del plano próximo a la misma se pone en contacto con la fase móvil, manteniendo todo el sistema cromatográfico en una cámara cerrada. La separación se produce por la migración diferencial de los componentes de la muestra en la dirección en que se mueve la fase móvil. Cabe distinguir dos tipos de cromatografía plana: en capa fina (CCF) y en papel (CP).

6.2.2.1.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

Esta técnica es una forma de cromatografía de adsorción que consiste en un adsorbente sólido (fase estacionaria), alúmina o gel de sílice, distribuido uniformemente sobre una superficie plana, generalmente vidrio. Este adsorbente presenta cierta capilaridad dada por las partículas finamente divididas y que permite que la fase móvil pase entre las partículas del adsorbente. La separación ocurre cuando uno de los componentes de la mezcla es retenido en mayor grado por la fase estacionaria que los otros componentes. La fase estacionaria puede modificarse de acuerdo a las necesidades de separación aunque el factor más importante para que esta se lleve en forma adecuada es la fase móvil elegida. El movimiento de cada sustancia en un determinado sistema es característico y puede ser un dato valioso en la identificación de ella. Esta característica se conoce con el nombre de Rf (relación de frente) y representa la distancia recorrida por el compuesto, en relación a la distancia recorrida por la fase móvil, por lo que sus valores siempre oscilarán entre 0 y 1.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto desde el origen}}{\text{Distancia recorrida por el frente de la fase móvil}}$$

Hasta hace relativamente poco tiempo, la CCF era considerada una técnica cualitativa, simple y rápida, para separar mezclas no demasiado complejas, pero su aplicación cuantitativa resultaba una pobre alternativa frente a otras técnicas cromatográficas como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). Sin embargo, actualmente, debido a los cambios introducidos en esta técnica, en lo que se refiere a la calidad de los adsorbentes, equipos para aplicar la muestra y sistemas de detección, el interés por la CCF ha vuelto a renacer, siendo considerada una técnica útil para separar y determinar cualitativa y cuantitativamente mezclas complejas a nivel de trazas. Estos cambios han llevado a modificar el nombre de la técnica, denominándola Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (CCFAR) (71).

6.2.2.1.2 Cromatografía en papel

Esta técnica se inició en 1944 (Consden, Gordon y Martín) cuando se demostró que al colocar una pequeña cantidad de una mezcla de solutos en forma de mancha sobre un papel filtro y sobre el mismo se deja eluir el disolvente, los componentes de la mezcla se desplazan a distintas distancias en el transcurso del tiempo. En la actualidad la Cromatografía en Papel (CP) es una técnica poco utilizada, excepto en algunos laboratorios para separar principalmente solutos hidrofílicos (71).

El soporte empleado en este tipo de cromatografía es una tira de papel filtro de un espesor y textura uniformes. En algunos casos se puede impregnar con un líquido que sea inmisible con la fase móvil; de esta manera, el proceso de partición se lleva a cabo entre los dos líquidos (72).

Las únicas ventajas que supone utilizar CP en lugar de la CCF se encuentra en que el papel es más barato y los cromatogramas son más fáciles de manipular, cortar y archivar.

6.2.2.2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

En la cromatografía en columna, un tubo estrecho de acero contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por presión o gravedad (73).

6.2.2.2.1 Cromatografía Líquido-Sólido (adsorción)

Muchos de los sólidos empleados como adsorbentes en cromatografía de columna son óxidos metálicos, óxidos hidratados y sales. Los más populares son el gel de sílice y la alúmina. En determinados casos se emplean otros adsorbentes especiales como el carbón activado y el polvo de poliamida (nylon). En el sentido cromatográfico, el término adsorción se limita a las interacciones que implican enlaces de hidrógeno o fuerzas electrostáticas.

El soporte sólido (alúmina activada, celulosa en polvo, ácido sílico) se introduce en forma de polvo seco o de pasta en un tubo (de vidrio, de plástico o de otro material adecuado) con un orificio inferior estrecho (generalmente protegido por un disco de vidrio poroso) para dar salida a la fase móvil.

La cromatografía líquido / sólido se aplica en la separación de sustancias de media o

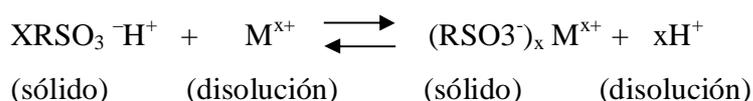
baja polaridad.

La regla general es elegir la polaridad del disolvente análoga a la de la muestra a emplear y en la mayoría de los casos adsorbentes poderosos (activos) para sustancias no polares y adsorbentes con menos actividad para sustancias más polares (72).

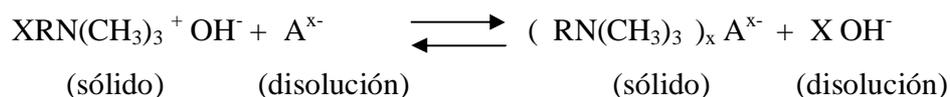
6.2.2.2.2 Cromatografía de intercambio iónico

Las separaciones de intercambio iónico se llevan a cabo con materiales especiales de estructura porosa e insolubles. Estos contienen grupos reactivos que están asociados a iones lábiles capaces de intercambiarlos con el medio que los rodea. Este es el único fenómeno que ocurre en el material durante todo el proceso, que invariablemente tiene lugar en el medio líquido (generalmente acuoso). Se puede considerar como una forma especial de cromatografía en la que la fase sólida contiene un material cambiador de iones, generalmente llamado resina de intercambio iónico. Se emplea en la separación de sustancias iónicas, tanto orgánicas como inorgánicas, de poli electrólitos, como enzimas, proteínas, hormonas, virus, ácidos nucleicos y otras sustancias biológicamente importantes.

El intercambio de iones consiste en el intercambio reversible del ión presente en la solución con un ión del polímero resinoso, celulosa modificada o soporte del gel de sílice; cuando un intercambiador iónico de ácido sulfónico se pone en contacto con un disolvente acuoso que contiene cationes M^{x+} , se establece un equilibrio de intercambio que puede describirse por:

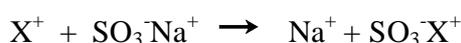


De una forma semejante, un intercambiador de base fuerte interacciona con los aniones A^{x-} según la reacción (71):



La elección de las resinas, fuertes o débiles, de tipo aniónico o catiónico,

dependerán en gran parte del pH en el cual deba realizarse el intercambio y de que cationes o aniones haya que intercambiar. Sin embargo, las resinas fuertemente ácidas y básicas se prestan a la mayoría de las aplicaciones analíticas. Su capacidad específica varía desde 2 milimoles por gramo hasta 5 milimoles por gramo. El coeficiente de selectividad indica la preferencia con que una resina de intercambio iónico fijo como $-\text{SO}_3^-$, junto con iones de carga opuesta. Estos últimos están presentes en la fase móvil en forma de sales. De esta manera las moléculas de muestras iónicas son retenidas en la columna por el intercambio iónico, de acuerdo a la expresión:



6.2.2.3 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

La cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de éstos materiales incluyen: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies metálicas y una variedad de sustancias inorgánicas (73).

6.3 MÉTODOS DE REVELADO

Cuando se ha realizado la separación, es muy importante, localizar la posición de las sustancias en el papel o bien en una cromatoplaça. Si las sustancias son coloreadas, esto no presenta dificultad, pero muchos compuestos principalmente aquellos que tienen interés biológico, son incoloros, y, por consiguiente, invisibles. En este caso se puede hacer uso de varios métodos. Los métodos físicos, que utilizan propiedades particulares de los compuestos, tales como la fluorescencia, son de aplicación muy limitada. El método generalmente más usado es hacer reaccionar a las sustancias a revelar con algún agente químico con el que formen algún compuesto coloreado (72).

6.3.1 MÉTODOS FÍSICOS

Muchos compuestos orgánicos, no saturados, presentan fluorescencia, debido a la propiedad de absorber las radiaciones ultravioleta y emitir radiaciones de mayor longitud de onda. Estos compuestos, aunque invisibles en el cromatograma con la luz ordinaria, pueden detectarse con una lámpara de rayos ultravioleta. La longitud de onda de la luz emitida, y, por consiguiente, el color que presenta, es característica del compuesto y se usa como método de identificación. En los tejidos vegetales existen numerosos compuestos fluorescentes (72).

El amplio desarrollo de la energía nuclear ha hecho posible disponer de un gran número de compuestos radiactivos como método alternativo para la investigación. Estos compuestos se pueden detectar en un cromatograma mediante un contador especial.

La ventaja principal de los métodos físicos es que, en general, no son destructivos de la muestra, mientras que los métodos químicos si lo son.

En la mayoría de los casos no puede emplearse el método físico, y por esto es necesario el empleo de técnicas químicas.

6.3.2 MÉTODOS QUÍMICOS

Los compuestos que son incoloros sobre el papel pueden colorearse mediante el empleo de algún agente de revelado. El revelador puede tratarse, en el caso más sencillo, de un gas (por ejemplo, el sulfuro de hidrógeno que se utiliza para revelar iones metálicos, con los que forme sulfuros coloreados), pero la mayoría de las veces los reveladores son líquidos o sólidos que se emplean en solución. Los disolventes de mayor uso son el agua, alcoholes etílico, metílico y butílico y acetona. El revelado se puede realizar en uno o varios pasos. En el último caso, generalmente es necesario secar el papel, al menos parcialmente, antes de cada paso. Algunas veces es necesario calentar para completar la reacción (72).

Una de las ventajas de la cromatografía en capa fina sobre la del papel es la posibilidad de revelado con agentes corrosivos, tal como los ácidos concentrados y compuestos fuertemente oxidantes, a alta temperatura, debido a la naturaleza inorgánica de la capa.

Hay varios métodos para aplicar el revelador: sumergiendo el papel en una solución

de éste, aspersión de la solución sobre el papel o a través de vapores del revelador.

6.3.2.1 Técnica de bañado

El material que se requiere para esta técnica es una bandeja poco profunda, fabricada de material inerte, en donde se coloca solución reveladora y se sumerge el cromatograma. Esta técnica no puede emplearse si alguno de los compuestos del cromatograma, o el producto coloreado del revelado, son solubles en el disolvente del revelador. En éstos casos se emplea la técnica de pulverizado (72).

6.3.2.2 Técnica de pulverizado

Esta técnica consiste en pulverizar uniformemente el revelador sobre la superficie del cromatograma por medio de un “atomizador”, que puede ser un pulverizador o aspersor especial para cromatografía (72).

6.3.2.3 Técnica de vaporización

Se realiza haciendo llegar vapores a la placa dentro de una cámara cerrada. Un reactivo muy empleado son los vapores de yodo, éste tiende a concentrarse en los sitios donde están los compuestos, por lo que aparece una mancha marrón oscuro, sobre un fondo amarillo pálido, pero al exponer la placa al aire, el yodo sublima y las manchas se decoloran en pocos minutos. En tanto que no reaccione el yodo con las sustancias, el método es extraordinariamente bueno como revelador no destructivo (71).

6.4 ESPECTROMETRÍA INFRARROJA

6.4.1 Generalidades

La espectrometría infrarroja se ha convertido en un instrumento indispensable como fuente de datos estructurales de sustancias orgánicas (74). Se basa fundamentalmente en la medición de la absorción de luz producida por la interacción de los grupos funcionales con energía radiante en el rango infrarrojo en función de la longitud de onda (75).

El espectro infrarrojo de un compuesto es esencialmente la superposición de bandas

de absorción de sus grupos funcionales específicos, aunque las interacciones débiles con los átomos circundantes de la molécula le confieren un sello de individualidad al espectro de cada compuesto (76).

La región del infrarrojo del espectro electromagnético se extiende desde el extremo del rojo del espectro visible hasta la región de las microondas. Esta región incluye radiación de longitudes de onda comprendidas entre 0.7 y 500 μm o en número de onda, entre 14,000 y 20 cm^{-1} . La región espectral más utilizada es la región del infrarrojo intermedio, que cubre frecuencias de 4000 a 200 cm^{-1} (2.5 a 50 μ).

El análisis en la región infrarroja es de gran importancia, ya que revela la presencia de grupos funcionales que conforman la estructura molecular de una sustancia pura, como éteres, alcanos, alquenos, aromáticos, alcoholes, fenoles, aminas, carbonilos, entre otros. La caracterización de sustancias químicas se logra mediante la verificación de bandas de absorción específicas a determinada frecuencia (77).

Una molécula de una sustancia cualquiera, no es una estructura rígida, ya que a temperatura ambiente, presenta diversas formas vibracionales:

a) Deformación en la variación de posición de los átomos con respecto al eje del enlace original.

b) Estiramiento lineal a lo largo del enlace a través de los átomos que la constituyen. Estas oscilaciones tienen un valor de frecuencia muy alto y específico al tipo de vibración de los átomos involucrados y al tipo de enlace existente entre ellas. La absorción de energía se produce cuando la radiación electromagnética toma los mismos valores de frecuencia que las oscilaciones vibracionales de la molécula, observándose una ampliación de la excitación en alguna de las formas vibracionales presentes, siendo la radiación infrarroja la que cuenta con los valores de frecuencia semejantes para afectar considerablemente la energía vibracional natural de una molécula, sin que ello implique la ruptura estructural de la misma.

Se debe considerar, que al ocurrir un cambio en la vibración molecular, se suscita una variación en el momento dipolar eléctrico. Al absorber energía radiante en la región infrarroja, siendo el momento dipolar de las moléculas la característica crucial en el análisis infrarrojo, ya que si no ocurre cambio en el momento dipolar, no podrá absorber radiación infrarroja electromagnética, tal como ocurre con el hidrógeno, oxígeno, flúor y CH_2CH_2

entre otros grupos funcionales.

6.4.2 Instrumentos de Infrarrojo

Para las medidas de absorción en el infrarrojo existen tres tipos de instrumentos disponibles comercialmente:

- 1) espectrofotómetros dispersivos de red que se utilizan principalmente para el análisis cualitativo;
- 2) instrumentos multiplex, que emplean la transformada de Fourier y resultan adecuados para la medidas en el infrarrojo tanto cualitativas como cuantitativas y
- 3) espectrofotómetros no dispersivos que se han desarrollado para la determinación cuantitativa de diversas especies orgánicas en la atmósfera por espectroscopia de absorción, de emisión y de reflectancia.

Una ventaja teórica de los instrumentos de transformada de Fourier es que su óptica hace posible la llegada al detector de una radiación de mayor potencia (uno o dos órdenes de magnitud) que la de los instrumentos dispersivos, en los cuales está limitada por la necesidad de usar anchuras de rendija pequeñas.

Las áreas de la química en las que las características adicionales de los instrumentos interferométricos parecen ser especialmente relevantes son:

- a) trabajos que requieren muy alta resolución, que corresponden a mezclas de gases que tienen espectros complejos como consecuencia de la superposición de las bandas vibracionales y rotacionales,
- b) estudio de muestras que presentan absorbancias elevadas,
- c) estudio de sustancias con bandas de absorción débiles (por ejemplo, el estudio de compuestos que se absorben químicamente en la superficie de los catalizadores),
- d) investigaciones que requieren barridos rápidos como los estudios cinéticos, o la detección de los eluyentes cromatográficos,
- e) obtención de datos de infrarrojo con muestras de muy pequeño tamaño,
- f) obtención de espectros de reflexión y
- g) estudios de emisión en el infrarrojo (71).

6.4.3 Aplicaciones en análisis cualitativo

Antes de correr un espectro de infrarrojo puede obtenerse mucha información sobre un compuesto o una mezcla; tal información incluye su estado físico, apariencia, la historia de la muestra, entre otras. Después de que se ha corrido el espectro, generalmente se estudia primero la región de estiramiento de hidrógeno –si el compuesto es orgánico- para determinar si la muestra es alifática, aromática o ambas; se hace un exámen posterior de la región de frecuencias de grupo para tratar de establecer los grupos funcionales que se encuentran presentes o que se han transformado a otros (76, 78).

6.5 ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA Y VISIBLE

6.5.1 Generalidades

Los métodos fotométricos son quizá los métodos espectroscópicos más utilizados en el análisis cualitativo y cuantitativo. Puesto que se mide la cantidad de luz visible u otro tipo de energía radiante absorbida por una disolución, la cual depende de la concentración de la sustancia absorbente y es así como se puede determinar cuantitativamente la cantidad presente de la o las sustancias de interés.

Los métodos colorimétricos se refieren a la determinación de una sustancia a partir de su capacidad de absorber luz visible. Estos métodos visuales se basan en la comparación de una disolución colorida de concentración desconocida con una serie de disoluciones estándar cuya concentración se conoce. En los métodos espectrofotométricos, la razón de las intensidades del haz de luz incidente y del haz de luz transmitido se mide a una longitud de onda específica mediante un detector adecuado, por ejemplo, una fotocelda.

El espectro de absorción proporciona también una huella digital para identificar, de modo cualitativo, a la sustancia absorbente (79, 80).

6.5.2 Instrumentos de absorción ultravioleta y visible

El equipo que se emplea para medir la absorción de luz se denomina espectrofotómetro. La luz de una fuente continua pasa a través de un monocromador, que selecciona una banda estrecha de longitudes de onda del haz incidente. Esta luz monocromática atraviesa una muestra de espesor b , y se mide la potencia radiante de la luz que sale (80).

6.5.2. 1 Instrumentos de doble haz

En un espectrofotómetro de haz simple cuyos componentes son:

- 1) fuente de lámpara o de sólido incandescente;
- 2) cubeta de la muestra;
- 3) selector de longitudes de onda;
- 4) detector fotoeléctrico y

5) sistema de tratamiento y lectura de señales, debe medirse primero el valor P_0 con una muestra de referencia por separado, este no es un procedimiento muy práctico, debido a que deben colocarse dos muestras diferentes en el haz de manera alternada. Esto causa inexactitud, porque tanto la intensidad de la fuente como la respuesta del detector fluctúan en el transcurso del tiempo. Si hay un cambio en algunas de ellas entre la medición de la disolución de referencia y de la muestra, la absorbancia aparente tendrá error.

En cambio en un detector de doble haz, cuyos componentes son:

- 1) fuente de luz
- 2) monocromador de barrido
- 3) motor
- 4) espejo
- 5) espejo rotatorio (entrecortador del haz)
- 6) celda para la muestra
- 7) celda para la referencia
- 8) espejo semitransparente
- 9) detector
- 10) amplificador

11) registrador, la luz pasa alternadamente por las celdas de muestra y de referencia. Esto se hace mediante un motor que hace girar un espejo dentro y fuera de la trayectoria de la luz. Cuando el espejo obturador intermitente (entrecortador) no desvía el haz, la luz pasa a través de la muestra, y el detector mide la potencia radiante (P_s). Cuando dicho espejo desvía el haz a través de la celda de referencia, el detector mide (P_r). De esta forma, la luz es desviada varias veces por segundo, y el circuito compara automáticamente P_r y P_s para obtener la absorbancia. Este procedimiento proporciona una corrección automática de

fluctuaciones en la intensidad de la fuente o en la respuesta del detector, dado que la potencia que sale de las dos muestras se compara con mucha frecuencia (80).

6.5.3 Aplicación de las medidas de absorción ultravioleta al análisis cualitativo

La espectrofotometría ultravioleta y visible tiene una aplicación algo limitada para el análisis cualitativo, ya que el número de máximos y mínimos de absorción es relativamente pequeño. Por tanto una identificación inequívoca es a menudo imposible.

A pesar de que no permite una identificación inequívoca de un compuesto orgánico, el espectro de absorción en las regiones de ultravioleta y visible es, sin embargo, útil para detectar la presencia de ciertos grupos funcionales que actúan como cromóforos (73).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La hipertensión arterial constituye un problema de salud pública en nuestro país. Los riesgos a nivel cardiovascular y renal, entre otros, que caracterizan a esta enfermedad son la principal causa de muerte. Esto implica un gasto anual millonario en medicamentos, visitas al médico y pruebas de laboratorio. A pesar de que en la actualidad existen fármacos con propiedades antihipertensivas, la búsqueda de principios activos con propiedades farmacológicas similares o superiores y con menores efectos colaterales no ha cesado. Por ello, la urgente necesidad de atender dicho problema de salud pública. El empleo de plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Sin embargo, frecuentemente se recomienda el uso de una planta sin tener un conocimiento científico de las partes de esa planta que deben ser empleadas, el procesamiento de la planta para obtener los principios activos que inducirán el efecto terapéutico, la vía de administración, el régimen de dosificación, el mecanismo de acción y lo más importante, si el empleo de la planta tiene el potencial terapéutico en el tratamiento de esa enfermedad en particular y si carece de efectos colaterales importantes. Debido a que la *Magnolia grandiflora* se ha empleado en medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos cardiovasculares, es importante conocer los efectos que pueden tener los extractos de sus hojas sobre la presión arterial en ratas normo e hipertensas. Esto con la finalidad de tener conocimiento fundamentado y en caso de poseer propiedades antihipertensivas puedan ser utilizados en la terapia como un posible coadyuvante en el control de ésta enfermedad y así dar un paso más en el avance de la ciencia.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de los extractos de las hojas de *Magnolia grandiflora* sobre la presión arterial de ratas con hipertensión arterial inducida por coartación de la aorta abdominal en comparación con ratas normotensas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Optimizar la obtención de los extractos acuoso y orgánico de las hojas de *Magnolia grandiflora* que muestren actividad hipotensora, con el fin de obtener principios activos estables para estudios posteriores de identificación.
2. Estudiar el efecto que produce la administración aguda de los extractos de *Magnolia grandiflora* sobre la presión arterial de ratas normotensas e hipertensas por coartación aórtica.
3. Explorar el posible mecanismo mediante el cual él o los principios activos de la *Magnolia grandiflora* modifican la presión arterial.
4. Identificar por vía grupo funcional, espectroscopia de infrarrojo, ultravioleta visible y cromatografía de líquidos (análisis cualitativos específicos), él o los principios activos, que generen el efecto hipotensor.

HIPÓTESIS

El o los principios activos contenidos en las hojas de *Magnolia grandiflora* disminuirán la presión arterial en ratas con hipertensión arterial secundaria a coartación aórtica.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Población de estudio: Ratas Wistar macho de 200 a 250 g de peso en condiciones de normotensión (grupo control) y de hipertensión.

Criterios de inclusión: Ratas control sin diferencias macroscópicas a nivel renal, que presentaron valores de presión arterial media entre 90 y 129 mmHg.

Ratas con coartación aórtica abdominal que presenten riñón derecho hipertrófico y riñón izquierdo isquémico, con valores de presión arterial media iguales o superiores a 130 mmHg.

Criterios de exclusión: Ratas sometidas a coartación aórtica que no hayan desarrollado isquemia del riñón o cuyos incrementos en la presión arterial con respecto al control fuera menor de 30 mmHg.

Criterios de eliminación: Ratas control o hipertensas que presenten abscesos o infecciones post-quirúrgicas.

Análisis estadístico: *t* de Student entre ratas control y coartadas con los extractos, *t* dosis por dosis.

MATERIAL

- Vasos de precipitado de 50, 100 y 1000 mL de capacidad (Pyrex)
- Mortero con pistilo de 20 cm de diámetro interno (Vitrex)
- Parrilla con calentamiento y agitación magnética (Corning)
- Columna para fraccionamiento (Quickfit Assemblaje)
- Estufa con vacío AN74 (H.W Anderson Products, inc. Anpro)
- Balanza analítica 2474 (Sartorius)
- Bomba para vacío SASSNXGTE-4870 (Fischer Scientific)
- Tubo de plástico para micro centrífuga de 2 ml (Eppendorf)
- Tabla para cirugía
- Cánulas desechables para animales de 38x 1.27 cm. (gauge 20)
- Hilo de seda 000 para suturas quirúrgicas (Atramet Pes No. 35690 SSA)
- Gasas estériles absorbentes clásica de 7.5 x 5 cm (Curis Laboratorios)
- Bisturí del #4 (Stiller)
- Pinzas de disección con dientes de ratón (Stiller)
- Pinzas de mosquito (Stiller).
- Pinzas hemostáticas rectas y curvas (Kelly)
- Pinzas de disección curvas (Stiller)
- Microjeringas Hamilton de 50,100 y 250 μ L (Modelo DT100)
- Jeringas de 1, 5 y 10 mL (Plastipak B-D 21Gx32 mm)
- Lámpara de luz ultravioleta de doble longitud de onda (254 – 365 nm), Modelo ENF-240C, Marca Spectroline
- Placas de sílica gel para capa fina GF 254 con revelador UV (23x125x0.5mm) , Modelo 7730/CC1000 (Merck)
- Cámaras de elución de 100 mm diámetro x 180 mm de altura (Pyrex)
- Cámaras de revelado para vapores químicos de 100 mm diámetro x 180 mm de altura (Pyrex)

- Aspersor (Pyrex)
- Tubos de ensaye de vidrio de 10 y 25 mL (Pyrex)
- Columna de 25 cm de largo por 0.4 cm de diámetro interno, empacada con Lichrosorb C-18 con un tamaño de partícula de 5 μm (Phenomex)
- Columna de 15 cm de largo por 4.6 mm de diámetro interno, empacada con Ultrasphere Octyl C-8 con un tamaño de partícula de 5 μm (Beckman)
- Celda de silvina con bromuro de potasio
- Celda de cuarzo de 1 cm de espesor

REACTIVOS

- Cloruro de calcio, reactivo analítico (Merck)
- Cloruro de sodio, reactivo analítico (Merck)
- Agua desionizada
- Hidróxido de sodio, reactivo analítico (Merck)
- Yodo resublimado, reactivo analítico (Merck)
- Formaldehído en solución (mínimo 37%), reactivo analítico (Merck)
- Bicarbonato de sodio (JT Baker)
- Silica gel (Merck)
- Sulfato de cobre pentahidratado, reactivo analítico (Merck)
- Etanol, disolvente (Sigma)
- Azida de sodio, reactivo analítico (Merck)
- Ácido clorhídrico, reactivo analítico (Fluka)
- Cloroformo, disolvente (Sigma)
- Nitrógeno, grado reactivo (Praxair)
- Carbógeno, grado reactivo (Praxair)
- Éter etílico, reactivo para análisis (Merck)
- Pentobarbital sódico (Pfizer)
- Heparina solución al 10 % (5000 UI/mL) (PISA)

- Indometacina (Sigma)
- L-NAME (Sigma)
- Ácido sulfúrico 95-97 % , reactivo analítico (Fluka)
- Dicromato de potasio, reactivo analítico (Merck)
- Ácido p-toluensulfónico, reactivo analítico (Fluka)
- Ácido tricloroacético, reactivo analítico (Sigma)
- Peróxido de hidrógeno 30 % , reactivo analítico (Merck)
- Cloramina T, reactivo analítico (Sigma)
- Clorhidrato de hidroxilamina, reactivo analítico (Merck)
- Cloruro férrico, reactivo analítico (Fluka)
- Hidroxilasa, reactivo analítico (Sigma)
- Metavanadato de sodio, reactivo analítico (Fluka)
- 2,3- Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ), reactivo analítico (Aldrich)
- Acetato de uranio, reactivo analítico (Fluka)
- Granalla de zinc, reactivo analítico (Aldrich)
- Permanganato de potasio, reactivo analítico (Merck)
- Cloruro de estaño (II), reactivo analítico (Merck)
- Yoduro de potasio, reactivo analítico (Merck)
- Azul de bromofenol, indicador pH 3-4.6 (Merck)
- Acetona, disolvente (Sigma)
- Nitrato de plata, reactivo analítico (Merck)
- Sulfanilamida, reactivo analítico (Merck)
- 1-butanol, disolvente (Sigma)
- Nitrito de sodio, reactivo analítico (Merck)
- Nitrato de talio, reactivo analítico (Merck)
- Carbonato de sodio decahidratado, reactivo analítico (Merck)
- Acetonitrilo, grado cromatográfico (Sigma)
- Metanol, grado cromatográfico (Sigma)
- Ácido fosfórico, reactivo analítico (Sigma)
- Estándar tiramina-taurina (USP)

- Estándar cafeína (USP)

EQUIPOS

- Polígrafo Grass Modelo 79D (Grass Instruments Co., Quincy Mass., USA)
- Transductor de presión Gould P23ID USA
- Cromatógrafo de líquidos, modelo System Gold, marca Beckman
- Espectrómetro de infrarrojo, marca Sintex, modelo IR/ H-12/ Computarizado
- Espectrómetro Modelo DW2000 Marca SLM Aminco Urbana Illinois, Ohio, USA

METODOLOGÍAS

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Las hojas de *Magnolia grandiflora* fueron recolectadas en el período de marzo a julio nativas del Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”, éstas se lavaron con tres soluciones: La disolución A se preparó mezclando cloruro de sodio 26.5 g, cloruro de calcio 5 g, yodo resublimado 0.1 g y formaldehído 5 mL en 2 litros de agua desionizada. La disolución B se preparó con 1 g de sulfato de cobre pentahidratado, 5 mL de ácido clorhídrico concentrado en 2 litros de agua desionizada (previamente calentada a 40°C antes de usarse) y la disolución C se preparó con 20.5 g de bicarbonato de sodio, 100 mL de etanol en 400 mL de agua desionizada. Las hojas se pasaron por cada una de las disoluciones mencionadas (A, B y C) y posteriormente se sometieron a secado entre 70 y 90 °C, durante dos horas. Se trituraron y pesaron para llevar a cabo la extracción con agua desionizada. Se calentó agua a 56 °C y se pasó a través de las hojas trituradas a fin de extraer la fracción hidrosoluble, se filtró y el filtrado fue dividido en dos porciones: una parte destinada para la extracción acuosa y otra para la fase orgánica (56).

EXTRACTO ACUOSO

La porción destinada para el extracto acuoso se agitó y burbujeo con nitrógeno por 15 min. Se prepararon 10 mL de ácido clorhídrico 2 N y 10 mL de ácido nítrico concentrado y gradualmente se adicionaron 10 mL de ácido nítrico concentrado sin dejar de

burbujear con nitrógeno y se dejó así durante 20 min. Se adicionaron 10 mL de etanol y se agitó por 10 min. Posteriormente se filtró el extracto acuoso y el filtrado se burbujeó con carbógeno durante 10 min. Se añadieron 10 mL de ácido clorhídrico 2 N y se burbujeó con carbógeno durante 10 minutos más. Se neutralizó la mezcla con hidróxido de sodio al 10 % y se filtró a través de una gasa muy fina. Enseguida se adicionaron 10 g de cloruro de sodio y se centrifugó a 6000 rpm, durante 15 min. El sobrenadante se hizo pasar por una columna cromatográfica, empacada con 20 g de sílica gel suspendida en 20 mL de agua desionizada y a las fracciones obtenidas se les agregó 10 mg de azida de sodio y se guardaron a -20°C .

EXTRACTO ORGÁNICO

A la fracción destinada para la extracción orgánica, se le burbujeó nitrógeno durante 20 min y se guardó a -20°C . Posteriormente se hicieron 5 extracciones con 20 mL de cloroformo cada una y los extractos obtenidos se mezclaron y se lavaron con solución salina al 10 %, enseguida se adicionaron 2 g de bicarbonato de sodio a los lavados y se volvieron a lavar con agua desionizada hasta alcanzar un pH de 7.0 a 7.5 y así se obtuvo la fase clorofórmica. Dicha fase se evaporó a presión reducida hasta la obtención de pequeños cristales los cuales se solubilizaron en etanol y se guardaron en refrigeración a -20°C .

GENERACIÓN DEL MODELO BIOLÓGICO DE HIPERTENSIÓN.

Método de coartación.

Se usaron ratas Wistar macho, de 200 a 250 g. Previamente anestesiadas con éter etílico y bajo condiciones asépticas, se les practicó una incisión en la región abdominal media de aproximadamente 3 cm. Y se llevo a cabo laparotomía en la que se expusieron las arterias renal derecha, mesentérica superior y aorta. En la aorta se practicó una ligadura parcial que se sitúo por debajo de las arterias renal derecha y mesentérica superior y por encima de la renal izquierda, con un hilo de seda No. 000, de forma suficiente para reducir en un 75% el flujo sanguíneo aórtico; se suturo el animal por planos y se mantuvieron a los animales por 28 días, tiempo en el que desarrolló la hipertensión dependiente de angiotensina II. Antes de la operación y durante el período post-operatorio, los animales tuvieron acceso libre a alimento y agua. Los animales control se sometieron al mismo

tratamiento, con excepción de la ligadura de la aorta (81).

MEDICIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL EN RATAS NORMO E HIPERTENSAS

Ratas Wistar macho testigo (control) y con coartación aórtica se les anestesió profundamente con pentobarbital sódico (63 mg/kg i.p). En seguida, se realizó traqueotomía para permitir la respiración, la canulación de la arteria carótida se consiguió mediante la realización de un corte en la parte frontal del cuello de la rata y separando los tejidos hasta exponerla, se disecó, se limpió de tejido conectivo y se refirió con dos hilos de seda No. 000. El flujo sanguíneo se interrumpió por oclusión de la arteria proximal al corazón con una pinza hemostática, y el lado distal se ligó definitivamente con hilo de seda. Se realizó un pequeño corte transversal en la arteria, tan cerca al extremo ligado como fue posible y en un ángulo que permitió levantar, con una pinza, la pared del vaso mientras se insertó la cánula y ésta se ligó alrededor del vaso con el segundo hilo. La cánula se alineó al vaso atándola al hilo colocado en la parte distal. La cánula estuvo conectada a la cámara del transductor de presión y ambos se llenaron previamente con solución salina heparinizada (10 unidades/mL). La presión arterial se registró a través de un transductor (Gould P23ID USA), conectado a un polígrafo Grass 7D (82). La administración de los extractos acuoso y orgánico de las hojas de magnolia se hizo vía arteria femoral, con previa cateterización.

Administración de Indometacina para exploración del posible mecanismo de acción del extracto crudo acuoso.

La participación de los metabolitos del ácido araquidónico vía ciclo oxigenasa se evaluó administrando a las ratas de ambos grupos, Indometacina (3 mg/kg i.v.) diluída en 1 mL de volumen final de bicarbonato de sodio al 4.8 %. La administración se llevó a cabo a una velocidad de 1 μ L/min. La presión arterial fué monitoreada durante la administración de indometacina y durante la respuesta a 60, 80 y 100 μ L del extracto crudo acuoso en presencia de indometacina.

Administración de L-NAME para exploración del posible mecanismo de acción del extracto crudo acuoso.

La participación del NO mediando la respuesta del extracto crudo acuoso de

Magnolia grandiflora fué evaluada administrando a las ratas de ambos grupos L-NAME (11 $\mu\text{mol/kg}$ i.v) en solución salina por 20 minutos. La administración se llevó a cabo a una velocidad de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. La presión arterial fué monitoreada durante su administración y durante la respuesta a 60, 80 y 100 μL del extracto crudo acuoso en presencia de L-NAME.

ANÁLISIS DE GRUPOS FUNCIONALES CONSTITUTIVOS MEDIANTE REACTIVIDAD QUÍMICA SELECTIVA.

Metodología para el proceso de identificación (83).

Para llevar a cabo la identificación de los grupos funcionales presentes en los extractos de las hojas de *Magnolia grandiflora* se aplicaron 2 μL de cada fracción por separado en una placa de silica gel para capa fina GF₂₅₄, eluyendo con 5 mL de cloroformo y se sometió cada placa a las siguientes técnicas de revelado:

Ácido sulfocrómico, reactivo general de identificación para sustancias orgánicas

Se disolvieron 5 g de dicromato de potasio en 100 mL de ácido sulfúrico al 40%, con esta disolución se roció la placa, dejándola secar durante 10 min y se calentó a 150 °C durante 15 min.

Ácido paratoluensulfónico para esteroides, flavonoides y catequinas

La placa cromatográfica se roció con una solución de ácido *p*-toluensulfónico al 20% en cloroformo, se secó a temperatura ambiente y posteriormente se calentó a 100 °C por 5 min.

Ácido tricloroacético para esteroides, glicósidos de digital y alcaloides de Veratrum

Para llevar a cabo la identificación de esteroides, glicósidos digitálicos y alcaloides de veratrum, se prepararon las siguientes disoluciones: A) ácido tricloroacético al 25%, B) ácido tricloroacético al 1%, ambas en cloroformo y C) 3.3 g de ácido tricloroacético en 10 mL de cloroformo con 2 gotas de solución de peróxido de hidrógeno al 30%. Las disoluciones se aplicaron en el siguiente orden: 1) solución A, 2) solución B y 3) solución

C, dejando secar la placa a temperatura ambiente en cada una de las aplicaciones. Posteriormente la placa cromatográfica se sometió a calentamiento durante 10 min a 120°C.

Cloramina T para cafeína

La presencia de cafeína en los extractos acuoso y orgánico de las hojas de *M. grandiflora*, fue evaluada mediante el uso de una disolución acuosa de cloramina T al 10%. La placa cromatográfica se roció con dicha solución y tras secar brevemente se roció con ácido clorhídrico 1 N. Posteriormente se calentó a 98°C, hasta la desaparición del olor a cloro y se saturó por 5 min con una disolución de amoníaco al 25%. Una vez seca la placa se calentó brevemente hasta que la coloración rosa de las manchas se hizo más intensa.

Cloro-pirazolona-cianuro para indoles, amidas y sulfonamidas

La identificación de indoles, amidas y sulfonamidas, se llevó a cabo mediante la reacción de cloración, se sometió la placa cromatográfica durante 3 min en una atmósfera de cloro, producida con una solución de permanganato de potasio al 25% en ácido clorhídrico. Se secó a temperatura ambiente por 5 min, después se calentó a 100°C, hasta eliminar el exceso de cloro, se enfrió la placa y se roció con A) 1-fenil-3-metil-5-pirazolona en piridina 0.2 M, hasta que comenzó a ponerse transparente, posteriormente se roció con B) cianuro de potasio 1 N y por último con una mezcla de volúmenes iguales de A y B.

Cloruro de estaño (II) - yoduro de potasio para iones oro

La identificación de iones oro, se realizó disolviendo 5.6 g de cloruro de estaño (II) en 10 mL de ácido clorhídrico al 36%. Posteriormente se diluyó a 100 mL con agua desionizada, en seguida se agregaron 0.2 g de yoduro de potasio y con esta solución se roció la placa cromatográfica, dejándola secar a temperatura ambiente.

Nitrato de plata- azul de bromofenol (reactivo de Wood) para purinas

La identificación de purinas, se llevo a cabo, mezclando volúmenes iguales de una disolución de azul de bromofenol al 0.4% en acetona y una disolución de nitrato de plata 2% en agua, con ésta mezcla se roció la placa cromatográfica, se colocó en un recipiente

que contenía solución de amoníaco al 25% y se secó con aire caliente para eliminar el exceso de éste.

Sulfanilamida diazoada (reactivo de Pauly según Kutáček) para fenoles, aminas copulativas y heterociclos

Para la identificación de fenoles aminas copulativas y heterociclos, se usaron las siguientes disoluciones: A) 3 g de sulfanilamida en 200 mL de agua desionizada, con 6 mL de ácido clorhídrico al 36% y 14 mL de 1-butanol. A 20 mL de esta disolución se le agregaron 0.3 g de nitrito de sodio, y B) disolución de carbonato de sodio al 10% en agua desionizada. Se roció la placa cromatográfica primero con la solución A y después de 10 min con la solución B. Se dejó secar a temperatura ambiente.

Posteriormente, se llevó a cabo la identificación de grupos funcionales, mediante la prueba a la gota, donde se hizo reaccionar la muestra con diferentes reactivos específicos para grupos como amidas, cetonas, imidazolininas y ácidos carboxílicos, siguiendo las siguientes técnicas:

Método de complejo de hierro (III) para identificación de amidas

Para la identificación de amidas, en un tubo de ensaye de 5 mL se colocó 0.1 mL de la muestra, se le agregó una gota de clorhidrato de hidroxilamina al 0.01%, se mezclaron e inmediatamente se le adicionó una gota de cloruro férrico al 0.01% y posteriormente una gota de hidroxilasa 1 N.

Método de oxidación de vanadio para identificación de cetonas

Para la identificación de cetonas, a 0.1 mL de la muestra se le adicionó una gota de etanol alcalino, enseguida una gota de metavanadato de sodio en disolución ácida al 0.001%, una gota de DDQ al 0.001% y por último 5 gotas de agua desionizada fría (-2 °C), con agitación constante.

Método de complejo de uranio para identificación de imidazolininas

Para la identificación de imidazolininas, se hizo reaccionar 0.1 mL de muestra, con una gota de hidróxido de sodio 1 N, una de acetato de uranio en medio acuoso al 0.0001%,

2 mg de granalla de zinc, lavada y secada previamente y por último una gota de ácido clorhídrico concentrado frío, con agitación constante.

Método de precipitación de talio para identificación de ácidos carboxílicos

Para la identificación de grupos carboxilos, a 0.1 mL de la muestra se le agregó una gota de nitrato de talio al 0.0001 % en medio acuoso, una gota de ácido clorhídrico al 0.002% y una gota de hidróxido de sodio al 0.002% caliente, la mezcla se agitó durante 1 min y después se enfrió a 4°C.

ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).

Se inyectaron 100 µL de muestra de cada extracto por separado y de los estándares a través de una columna de octil-celulosa cuyas dimensiones son de 4.6 mm diámetro interno y 15 cm de largo, usando como fase móvil agua/acetonitrilo (5:95 v/v), a una velocidad de flujo de 5 mL/min, con una presión del sistema de 0.5 ± 0.05 kpsi y de 1.2 ± 0.10 kpsi para la segunda corrida analítica, en un cromatógrafo de líquidos System Gold de Beckman.

ANÁLISIS ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

Los extractos concentrados obtenidos, acuoso y orgánico, de las hojas de *Magnolia grandiflora*, se colocaron por separado en celdas de silvina con bromuro de potasio, colocando la celda en la respectiva portacelda del espectrofotómetro de infrarrojo, se seleccionó una velocidad de barrido de $10 \text{ cm}^{-1}/\text{seg}$. en un rango de 4000 a 500 cm^{-1} , a su vez se ajustó a cero de absorbancia en automático y 100 % de transmitancia, voltaje y sistemas de lámparas, así como ajuste automático a cero de absorbancia, rejillas, sistema de detección, en el modo preescaneo. Ya verificados los ajustes se procedió a registrar el espectro de los extractos.

ANÁLISIS ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

El extracto crudo obtenido de las hojas de *Magnolia grandiflora* se colocó, previamente filtrado (membrana de nitrocelulosa de 0.8 µcm), en una celda de cuarzo de

1cm de espesor. Posteriormente, se efectuó un barrido espectral abarcando la región ultravioleta-visible (0-1100 nm). Ya verificados los ajustes se procedió a registrar el espectro del extracto en comparación con un blanco (medio extractor agua).

Una vez terminado el análisis espectral del extracto respectivo, se realizó una prueba química para detección de aminas aromáticas en la muestra. La cual se corrió bajo los mismos parámetros que el espectro inicial una vez agregado a la celda 200 uL del marcador de aminas aromáticas (acetiluro de amonio en medio amoniacal en presencia de sales de cobalto amortiguadas a pH 4.6 con ácido acetyl-acetato) (84).

RESULTADOS QUÍMICOS

La extracción de los principios activos de *M. grandiflora* rindió dos fases: 1) Fase acuosa y 2) Fase orgánica. La fase acuosa estuvo constituida por un líquido color café dorado, cuyos componentes fueron separados por cromatografía en columna, obteniéndose las fracciones I y II. La fracción I de color amarillo tenue y la fracción II de coloración café dorada. Por otro lado, el extracto clorofórmico presentó cristales casi blancos que fueron disueltos en alcohol para su posterior administración.

Tabla 4. Análisis de grupos funcionales mediante reactividad química selectiva.

Prueba Química	Resultado
Nitrosaminas Ácido sulfocrómico, reactivo general de identificación para sustancias orgánicas	Positiva
Esteroides, flavonoides y catequinas Ácido paratoluensulfónico para esteroides, flavonoides y catequinas	Positiva
Terpenos Ácido tricloroacético para esteroides, glicósidos de digital y alcaloides de Veratrum	Positiva
Cafeína Cloramina T para cafeína	Positiva
Amidas Cloro-pirazolona-cianuro para índoles, amidas y sulfonamidas	Positiva
Xantinas Cloruro de estaño (II) - yoduro de potasio para iones oro y método de complejo de fierro III	Positiva
Purinas Nitrato de plata-azul de bromofenol (reactivo de Wood) para purinas	Positiva
Heterociclos Sulfanilamida diazoada (reactivo de Pauly según Kutáček) para fenoles, aminas copulativas y heterociclos	Positiva
Cetonas Método de oxidación de vanadio	Positiva
Imidazolinas Método de complejo de uranio	Negativa
Ácidos carboxílicos Método de precipitación de talio	Positiva

ANÁLISIS DE RESULTADOS QUÍMICOS.

Análisis cromatográfico y de pruebas a la gota

El análisis por cromatografía en capa fina nos permitió identificar varios grupos funcionales (Tabla 4).

Las nitrosaminas, al ser reveladas con dicromato de potasio en ácido sulfúrico, presentaron una fluorescencia azul en la parte superior de la placa cromatográfica, lo que es característico de los compuestos orgánicos presentes en los extractos acuoso y clorofórmico de las hojas de *Magnolia grandiflora*, cabe mencionar que también se observaron compuestos inorgánicos en ambos extractos, ya que se presentó una coloración amarilla-anaranjada en la parte inferior, que no reaccionó con el sistema revelador.

Con el ácido *p*-toluensulfónico en cloroformo, se identificaron esteroides, flavonoides y catequinas en los extractos orgánico y acuoso de las hojas de *Magnolia grandiflora*, por la presencia de manchas fluorescentes observadas a la luz UV de onda larga, características de estos grupos funcionales.

Otro método empleado indicativo de la presencia de esteroides, glicósidos de digital y alcaloides de Veratrum, es utilizando ácido tricloroacético en cloroformo a diversas concentraciones, el cual presentó diferentes coloraciones al ser observada la placa a la luz natural, así pues, se tuvo un color anaranjado fuerte en la parte superior, seguido de una coloración rosa salmón, un color rosa pálido, manchas blancas y en la parte inferior blanco, a longitud de onda corta de 254 nm, reveló sólo emisión de fluorescencia violeta, en cambio a luz UV de longitud de onda larga, el rosa pálido observado a luz natural en la parte superior de la placa, reveló de color azul violeta y la mancha de color rosa salmón reveló dos colores azul blanquecino brillante que emitió fluorescencia y arriba de éste un color amarillo limón que también era fluorescente, lo que presume la existencia de dos grupos funcionales.

La presencia de cafeína en ambos extractos, se identificó haciendo reaccionar una solución de cloramina T en agua, y posteriormente con ácido clorhídrico 1 N, la cual

presentó manchas de color rosa, que se hizo más intenso mediante calentamiento. Este color es característico de la presencia de la cafeína, sin embargo para identificarla plenamente, se analizaron los extractos acuoso y orgánico, por medio de HPLC dando positivo el análisis, ya que al correr el estándar de cafeína, por CLAR, junto con los extractos, éstos presentaron tiempos de retención similares a los relativos observados para el estándar.

Los grupos funcionales como indoles, amidas y sulfonamidas en los extractos, se identificaron a través del revelado con cloro-pirazolona-cianuro, observándose después de ello manchas de color rojo que viraron a azul después de 2 minutos, característico de estos grupos.

Al revelar las xantinas con cloruro de estaño (IV), éstas aparecieron en forma de manchas blancas, algunas de ellas no revelaron debido a que se complejaron, esto observado en el punto de aplicación de las muestras, ya que ahí apareció un color negro, esto sucede cuando no reaccionan con el revelador.

En los extractos de las hojas de *Magnolia grandiflora*, también estuvieron presentes las purinas, ya que al ser reveladas con nitrato de plata-azul de bromofenol (reactivo de Wood), éstas presentaron fluorescencia azul blanquecina a longitud de onda de 365 nm, a la luz visible revelo de color amarillo claro, sin embargo, con este sistema revelador, los compuestos poco polares no revelaron ya que se diluyó con mezcla polar.

Por otra parte, los grupos heterocíclicos, fenoles y aminas copulativas con el reactivo de Pauly según Kutácek (sulfanilamida diazoada), se hicieron notar mediante manchas blancas características de los grupos heterocíclicos, además se puede inferir la presencia de los fenoles y aminas, ya que en la placa cromatográfica se observaron también manchas de color anaranjado y amarillas negruzcas.

A través del análisis a la gota, se pudieron identificar grupos funcionales específicos, como las cetonas, que se hicieron presentes por la aparición de un color naranja intenso, dando positiva la reacción, ya que se llevó a cabo la oxidación del vanadio, por lo que se infiere que hay un grupo cetónico en los extractos de las hojas de *Magnolia grandiflora*. Asimismo, se observó la presencia de ácidos carboxílicos, ya que al hacer reaccionar el nitrato de talio, con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, se formó un precipitado blanco, para confirmar, éste se trato con cloruro de oro, formándose así un

precipitado de color amarillo paja, que viró a azul marino.

Sin embargo, al hacer reaccionar los extractos para formar el complejo de uranio, con granalla de zinc y ácido clorhídrico, no se observó cambio de color en la reacción, dando negativa la presencia de imidazolinas.

Todo este análisis nos da la pauta para enfocar el estudio de reactividad funcional en base a los grupos detectados, lo cual permitirá afinar el método de análisis a la gota para aplicar con precisión las pruebas químicas específicas para la detección de la o las sustancias que resulten bioactivas en estos extractos.

Análisis de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

En el cromatograma del extracto crudo de las hojas de *M. grandiflora* (Figura 4a) obtenido mediante ésta técnica y corrido en condiciones similares a la referencia (mezcla tiramina-aurina, Figura 4a), se pudo notar la presencia de tiramina en la muestra, ya que a simple vista, el extracto presentó un pico corresponde a la referencia de tiramina, en éste caso, el pico es similar en posición, tamaño y en tiempo de retención.

Al sobreponer los cromatogramas tanto de muestra como referencia, como se ve en la parte b, corroboramos la presencia de la tiramina en el extracto, lo que nos da la pauta para señalar que éste compuesto ésta presente en el extracto crudo, según lo señalado por Matsutani en 1975 (59).

Otro compuesto de interés identificado por análisis vía grupo funcional y verificando a través de CLAR, fue la cafeína, la cual al estar presente en los extractos puede ocasionar elevaciones agudas de la presión arterial (85-87). Se muestran los cromatogramas (Figura 5) en la parte a, estándar de cafeína (parte superior) y de extracto crudo de las hojas de *M. grandiflora* (parte inferior), corridos de manera similar, el extracto presenta el pico característico del estándar de cafeína. Aunque al sobreponer los cromatogramas parte b, se observa que esta presente la cafeína en el extracto crudo, corroborándose al ajustar los tiempos de retención.

Al realizar el estudio con el extracto orgánico, se observa (Figura 6a), estándar de cafeína (parte superior) y extracto orgánico (parte inferior), en la parte b al sobreponer las muestras y en la parte c al corregir los tiempos, se ve claramente la presencia de la cafeína

en el extracto y en mayor proporción, ya que presentan tiempos de retención, posición y tamaño similares.

Para el extracto acuoso fracción I, en la parte **a** (Figura 7), parte superior el cromatograma del estándar de cafeína y en la parte inferior el cromatograma del extracto. El pico de la muestra es de menor tamaño que la referencia, se puede ver en la parte **b**, al sobreponer los picos y en la parte **c** en la corrección de los tiempos de retención, lo cual indica que también esta presente la cafeína en éste extracto.

Análisis de Espectroscopia de Infrarrojo

Como prueba presuntiva, cada uno de los extractos obtenidos de las hojas de *Magnolia grandiflora* (crudo, acuoso fracción I y orgánico), se analizaron bajo espectroscopia de infrarrojo en celdas de Silvina-AgBr encontrando lo siguiente:

Se puede ver que en el extracto crudo (Figura 8), entre los 4000 y 2856 cm^{-1} , existe la posibilidad de encontrar grupos funcionales de tipo hidroxilo (3450 cm^{-1}), metilo (2925 cm^{-1}) e inflexiones alquílica (2939, 2880 y 2850 cm^{-1}). De los 2410 a los 1500 cm^{-1} , se tiene identificado tres picos o bandas que corresponden a grupos carbonilo ya sea en ácidos carboxílicos o formando algún otro tipo de compuesto como ésteres (1736 cm^{-1}), amidas (1685 cm^{-1}) e iminas (1649 cm^{-1}). A los 1500 y 1070 cm^{-1} tenemos la presencia de la banda indicativa del grupo nitrosaminas N-N=O (1448 cm^{-1}) e isocianato o nitro aromático (1352 cm^{-1}), amina (1168 cm^{-1}) y, al final, a los 1070 y 400 cm^{-1} , se tiene una banda típica de las cetonas (1030 cm^{-1}), nitrosaminas (1019 cm^{-1}). A partir de 1000 cm^{-1} se encuentran los sobretonos 640, 599 y 490 cm^{-1} , que son característicos para grupos esteroideos o carbonilos, que de igual manera que en el extracto acuoso los pueden estar enmascarando y, el último sobretono (490 cm^{-1}) indica la flexión del grupo imina.

En el espectro de IR del extracto orgánico (Figura 9), el pico variante en la región de 4000 a 2856 cm^{-1} , en comparación con el extracto crudo, es el que identifica al grupo funcional metilo (2925 cm^{-1}) ya que éste, esta más definido y, los que representan al grupo carbonilo por lo general no varían (2880 y 2850 cm^{-1}). Al igual que en la región de 2410 a 1500 cm^{-1} el pico característico del grupo éter (1736 cm^{-1}) se ve más definido. De nueva cuenta, se observa en este espectro, el pico de la imina (1649 cm^{-1}) y de 1500 a 1070 cm^{-1}

se tienen diversas bandas, que indican de manera presuntiva la presencia de grupos tales como aminas (1168 cm^{-1}) y los respectivos sobretonos que aparecen en los espectros anteriores.

El extracto acuoso fracción I, entre los 4000 y 2856 cm^{-1} , muestra una banda típica de grupos funcionales hidroxilo (3450 cm^{-1}). En la región comprendida entre 2410 y 1500 cm^{-1} , se observa la presencia de grupos carbonilo (1736 cm^{-1}) polifuncionales y muy particularmente de tipo cetónico (1685 cm^{-1}); así mismo, se observa la presencia de iminas (1649 cm^{-1}). Entre 1500 y 1070 cm^{-1} , existe la presencia de cuatro bandas, las cuales corresponden a grupos vinilamínicos (1460 cm^{-1}), moléculas de amonio (1408 cm^{-1}), aromáticos (1352 cm^{-1}) y aminas (1168 cm^{-1}). Por último entre 1070 y 400 cm^{-1} , se observa la banda característica del grupo funcional éter alifático (1030 cm^{-1}). Cabe mencionar que a partir de 1000 cm^{-1} se encuentran los sobretonos o huellas confirmativas que ratifican la señal correspondiente al grupo funcional detectado en la región de los 4000 a 1000 cm^{-1} . Es importante señalar, que en este caso en particular, como se trata de una muestra que contiene una mezcla de sustancias, los sobretonos observados, pueden enmascarar grupos funcionales de interés, como en este caso los carbonilos o esteroides que enmascaran a grupos funcionales de menor absorción a la radiación infrarroja. Así pues, se tiene que a los 992 y 983 cm^{-1} , se presentan bandas de flexión del enlace carbono-hidrógeno (C-H) fuera del plano correspondiente a los alquenos y, a los 599 cm^{-1} , hay un sobretono con ligeras curvaturas que enmascara a los grupos carboxilatos y esteroides no hormonales. Por último, el sobretono encontrado a los 490 cm^{-1} indica una flexión del enlace carbono-oxígeno-nitrógeno (CON) que corresponde a una amida presente en el extracto acuoso (Figura 10).

Como se puede ver en los espectros de infrarrojo de cada extracto, existen diferencias en cuanto a las bandas encontradas entre 4000 y 2856 cm^{-1} debido a que en el extracto acuoso se puede observar la presencia de una sola banda a los 3450 cm^{-1} mientras que en el extracto orgánico y crudo, hay similitud en las bandas encontradas a los 2925 , 2980 y 2850 cm^{-1} .

Análisis de Espectrofotometría Ultravioleta y Visible.

El espectro ultravioleta visible de la muestra, en éste caso sólo del extracto crudo, ya que éste presentó el efecto farmacológico deseado, esta representado en **A** (Figura 11), el espectro ultravioleta visible del extracto crudo más el marcador de aminas aromáticas en **B** (Figura 12) y la sobreposición de ambos espectros (Figura 13), en donde se visualiza que el área bajo la curva entre uno y otro reporta una reacción de intensificación de aminas aromáticas, así pues, se llevó a cabo la identificación cualitativa de aminas aromáticas, ya que se ha visto que algunas, como la feniletildiamina, presentes en la mayoría de las plantas de éste género, producen efectos vasodilatadores.

Estos datos tan sólo pueden servir como una guía aproximada para la identificación de moléculas, debido a que las posiciones de los máximos se ven también afectadas por la composición de la muestra.

ANÁLISIS DE RESULTADOS FARMACOLÓGICOS.

En la evaluación farmacológica de la administración de las diferentes fracciones obtenidas de *M. grandiflora* encontramos que el extracto crudo tiene efecto hipotensor (Gráfica 1), mientras que las fracciones acuosa I (Gráfica 2) y orgánica (Gráfica 3) producen el efecto contrario (hipertensión). El efecto hipotensor se presentó tanto en las ratas normotensas como en las hipertensas, en forma independiente de óxido nítrico y de prostaglandinas. Estadísticamente no se encontró diferencia significativa entre ellas. En el extracto crudo se encuentran presentes diferentes compuestos que posiblemente ejercen algún efecto en la presión arterial, como lo son el vulgarenol, 2-*p*-hidroxifenil-2-hidroxi-etilamina, magnograndiólido, tiramina, entre otros.

Cuando se administraron los extractos acuoso (Fracción I) y orgánico se produjo un aumento en la presión arterial, este efecto puede ser atribuido a la presencia de cafeína y tiramina, las cuales aumentan la tensión arterial, estimulando al sistema nervioso central e incrementando la actividad del corazón produciendo vasoconstricción.

Al observar que el efecto deseado se presentó con la administración del extracto crudo a las dosis de 60, 80 y 100 μL , se procedió a evaluar el posible mecanismo por el

cual se dá la disminución de la presión arterial en ratas hipertensas por coartación de la aorta. Administramos *L-NAME*, el cual inhibe la síntesis del óxido nítrico (88) para evaluar su posible participación. Nuestros resultados muestran que el extracto crudo mantuvo su capacidad hipotensora aún en presencia de *L-NAME*, lo que indica que los compuestos contenidos en el extracto crudo de las hojas de *Magnolia grandiflora* actúan por un mecanismo que no involucra la participación del NO.

De forma semejante, se hizo uso de la indometacina (89), para inhibir la síntesis de prostaglandinas. El efecto hipotensor obtenido con la administración del extracto crudo persistió a pesar de la presencia de Indometacina, lo cual indica que los compuestos contenidos en el extracto crudo de las hojas de *Magnolia grandiflora* actúan por un mecanismo que no involucra la participación de las prostaglandinas.

Análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Estudio comparativo del extracto crudo de las hojas de *M. grandiflora* y mezcla de estándares de tiramina-aurina.

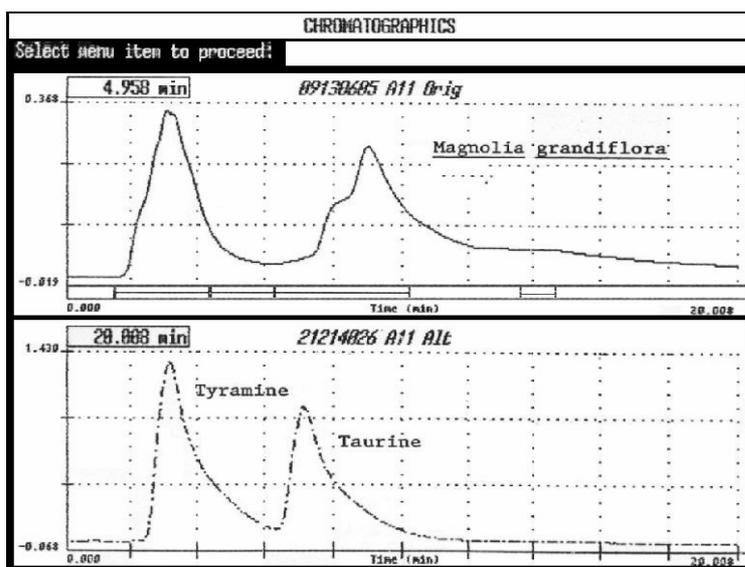
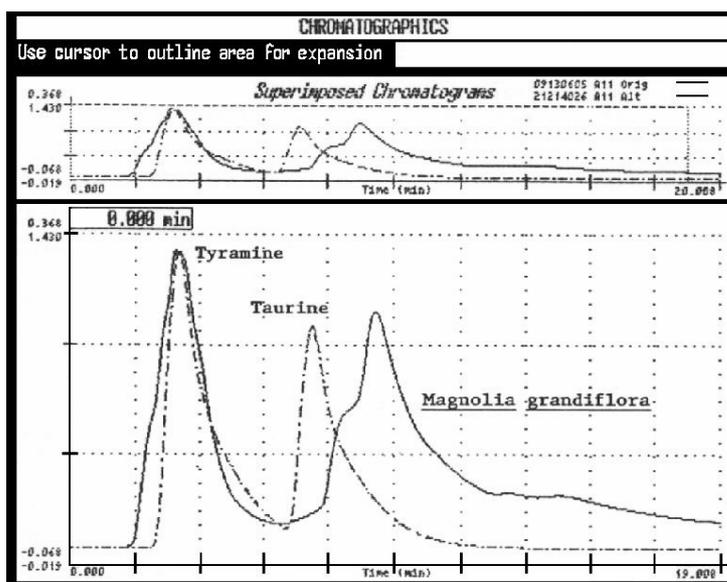


Figura 4a. En la parte superior podemos observar el cromatograma obtenido del extracto crudo de las hojas de *M. grandiflora* y en la parte inferior el cromatograma obtenido de la mezcla de estándares tiramina-aurina.



Parte b. En ésta figura se ve la superposición de los cromatogramas del extracto crudo de

las hojas de *M. grandiflora* y la mezcla de estándares tiramina-taurina.

Estudio comparativo del extracto crudo de las hojas de *M. grandiflora* y estándar de cafeína.

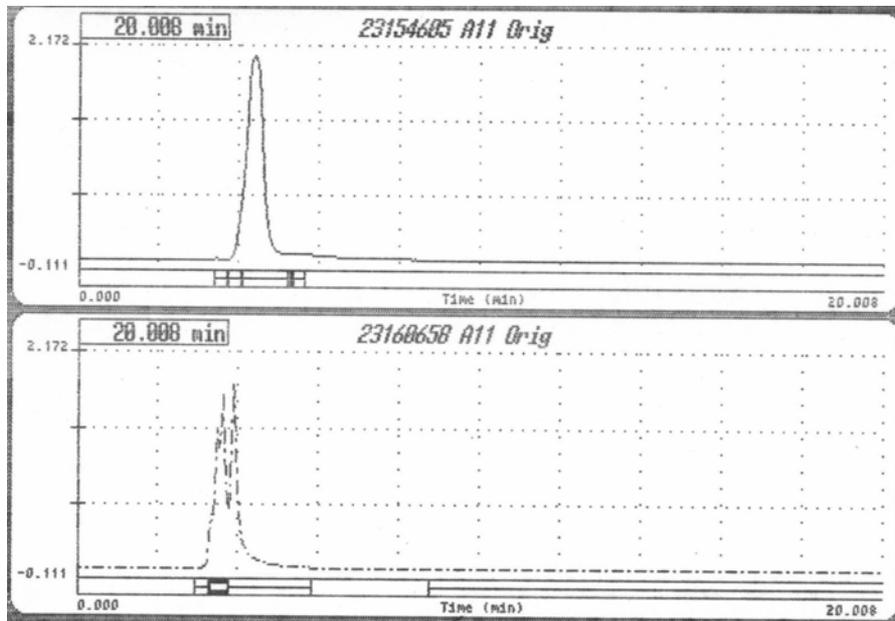
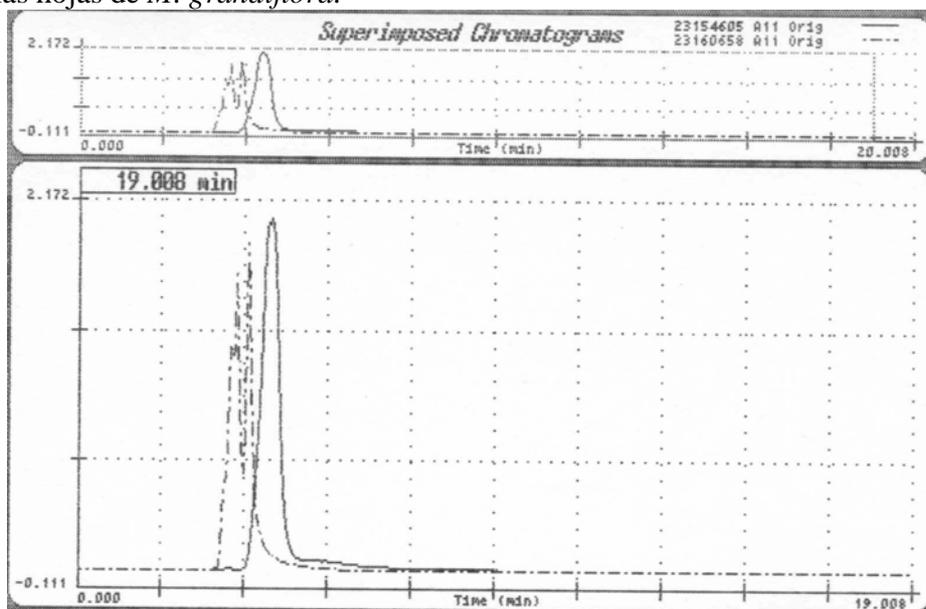
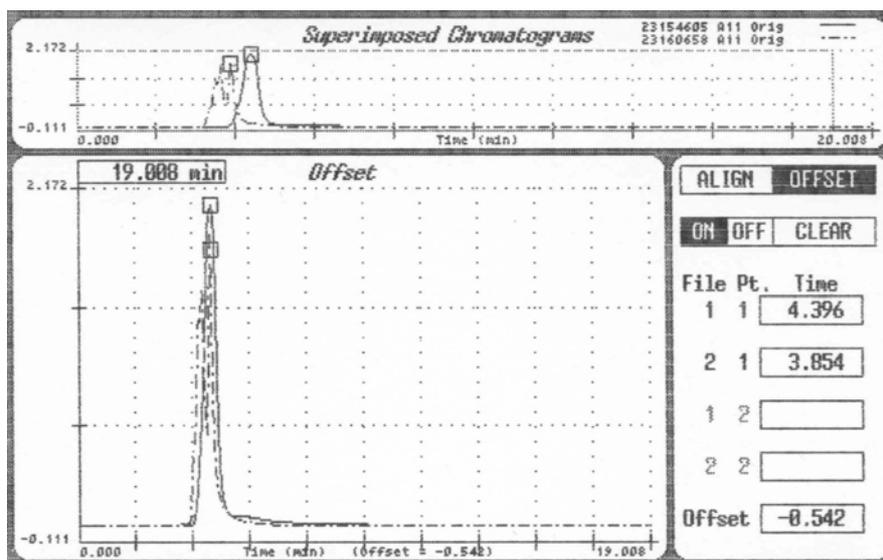


Figura 5a. En la parte superior podemos observar el cromatograma obtenido del estándar de cafeína y en la parte inferior el cromatograma obtenido del extracto crudo de las hojas de *M. grandiflora*.



Parte b. Superposición de los cromatogramas del extracto crudo de *M. grandiflora* y el estándar de cafeína.



Parte c. Corrección de tiempos de retención para comparación entre estándar de cafeína y extracto crudo de las hojas de *M. grandiflora*.

Estudio comparativo del extracto orgánico de las hojas de *M. grandiflora* y estándar de cafeína.

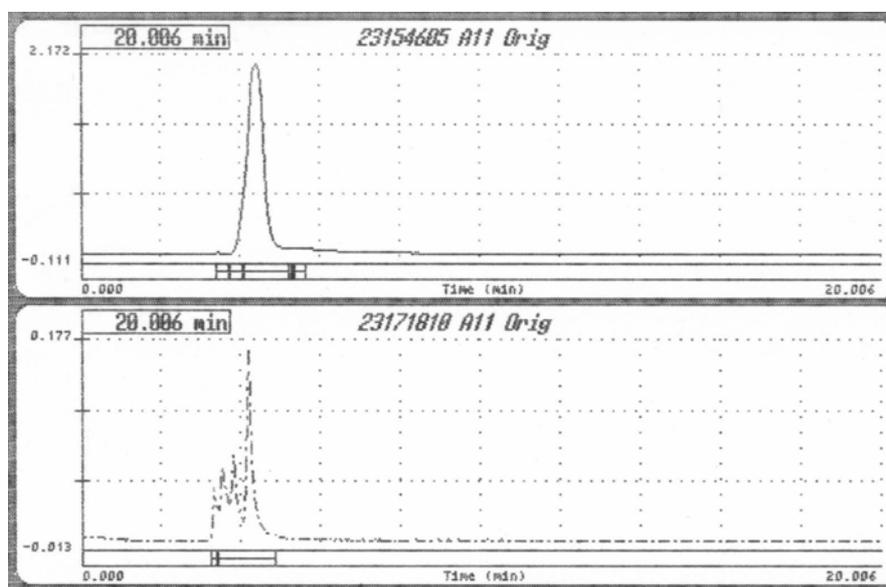
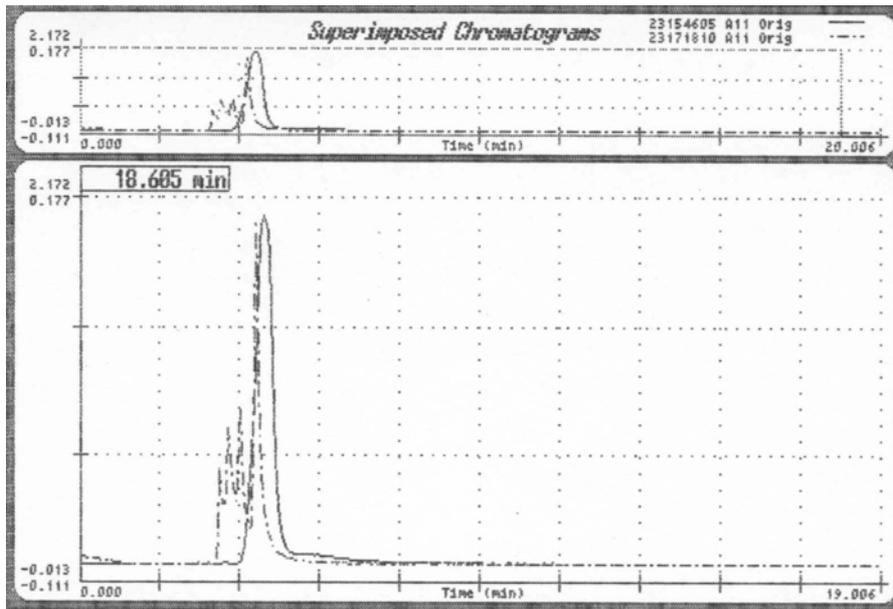
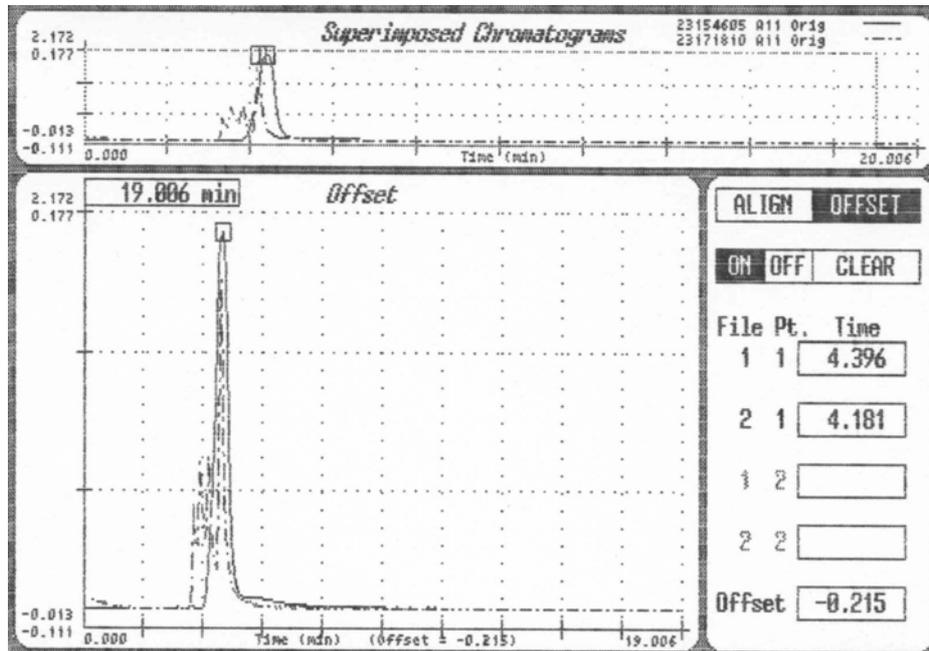


Figura 6a. En la parte superior podemos observar el cromatograma obtenido del estándar de cafeína y en la parte inferior el cromatograma obtenido del extracto orgánico de las hojas de *M. grandiflora*.



Parte b. Superposición de los cromatogramas del extracto orgánico de las hojas de *M. grandiflora* y el estándar de cafeína.



Parte c. Corrección de tiempos de retención para comparación entre estándar de cafeína y extracto orgánico de las hojas de *M. grandiflora*.

Estudio comparativo del extracto acuoso fracción I de las hojas de *M. grandiflora* y estándar de cafeína.

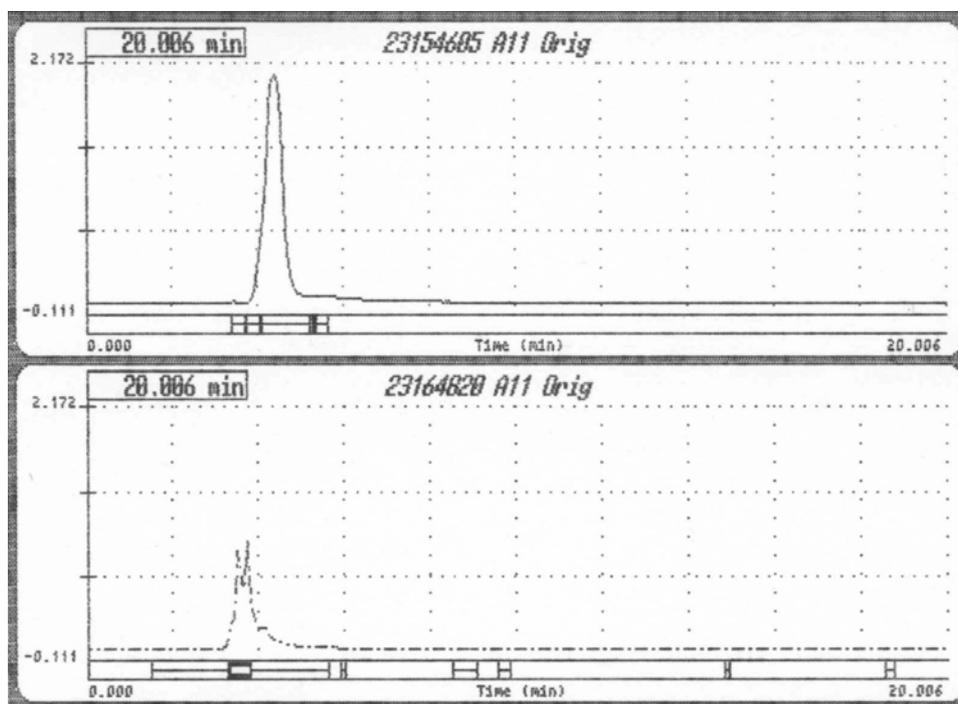
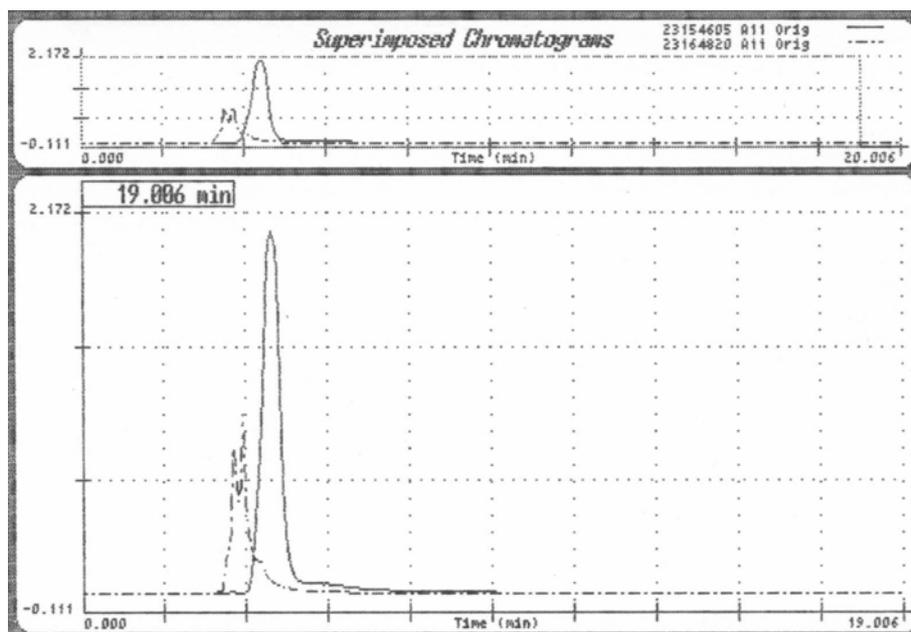
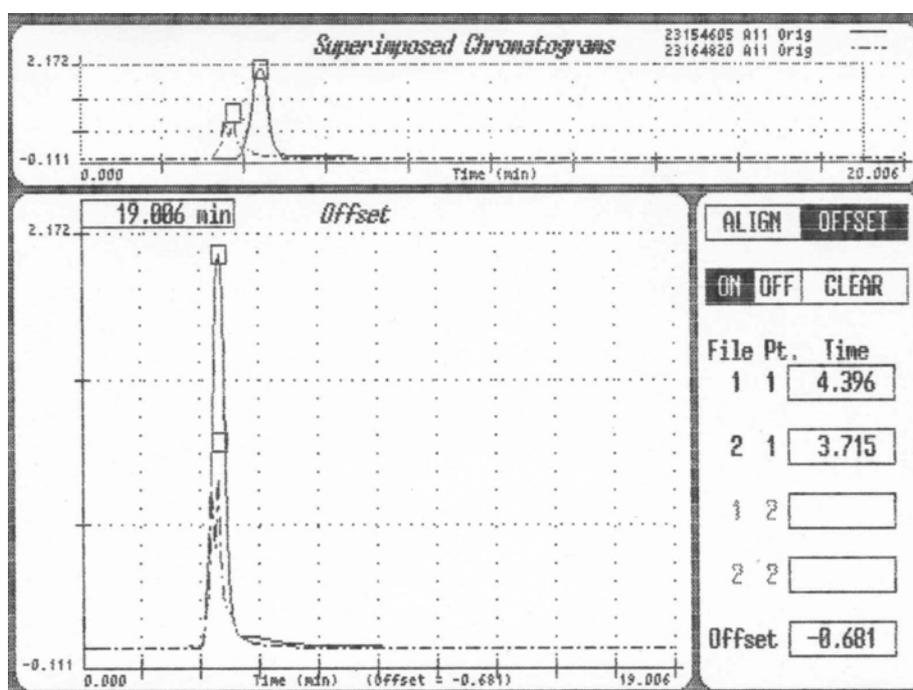


Figura 7a. En la parte superior podemos observar el cromatograma obtenido del estándar de cafeína y en la parte inferior el cromatograma obtenido del extracto acuoso fracción I de las hojas de *M. grandiflora*



Parte b. Superposición de los cromatogramas del extracto acuoso fracción I de las hojas de *M. grandiflora* y el estándar de cafeína.



Parte c. Corrección de tiempos de retención para comparación entre estándar de cafeína y extracto acuoso fracción I de las hojas de *M. grandiflora*.

Análisis por Espectroscopia de Infrarrojo

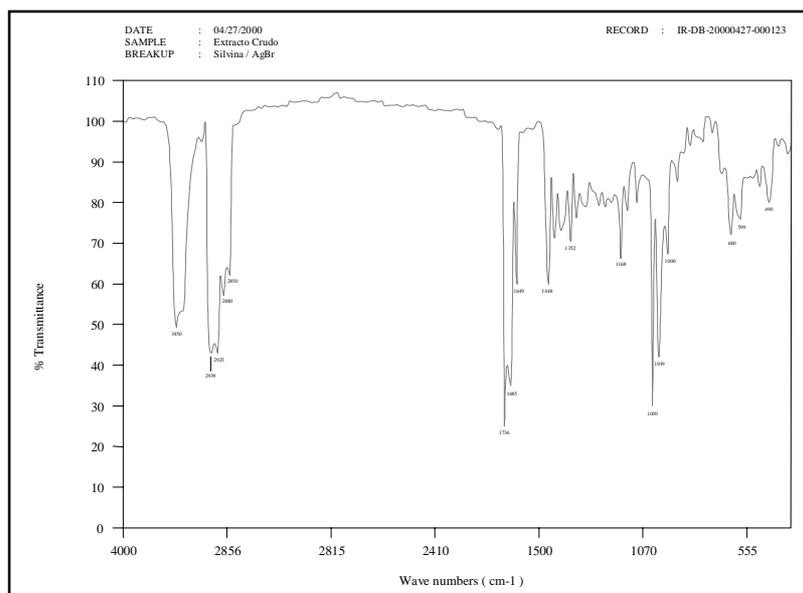


Figura 8. Espectro IR obtenido del extracto crudo de las hojas de *M. grandiflora*.

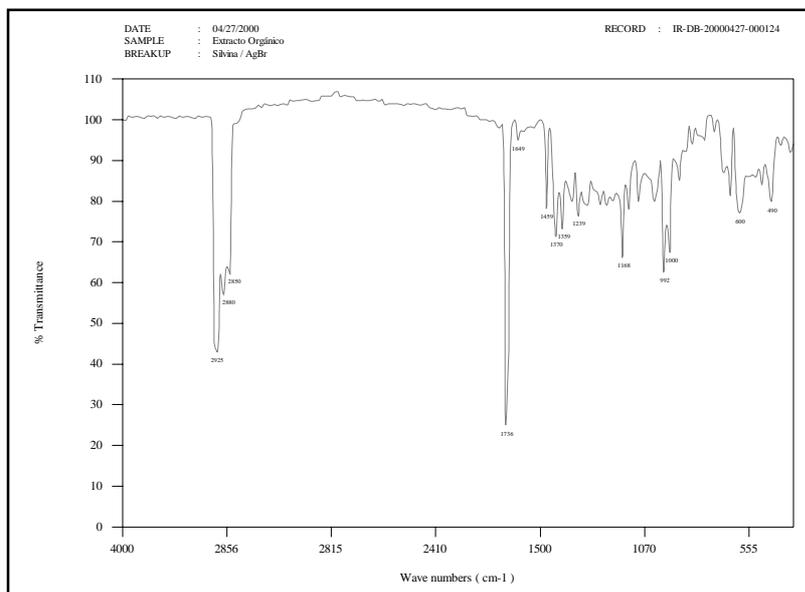


Figura 9. Espectro IR obtenido del extracto orgánico de las hojas de *M. grandiflora*.

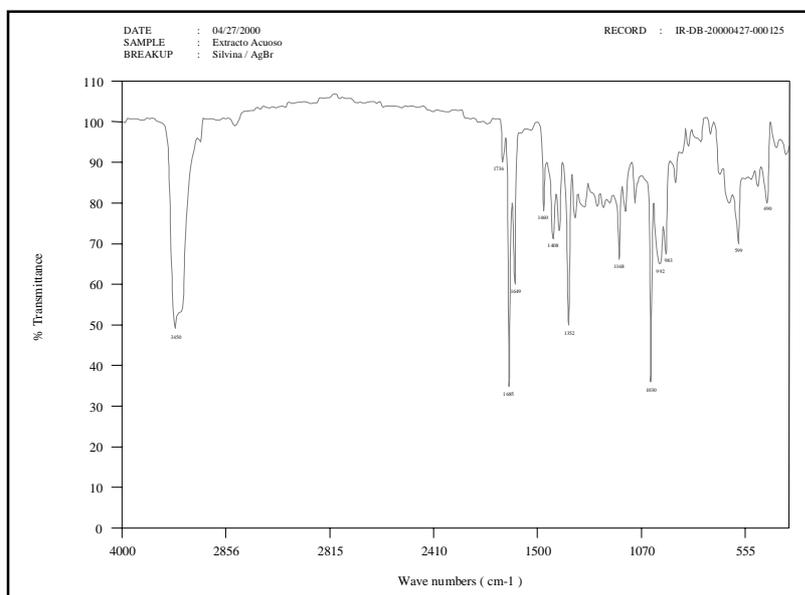


Figura 10. Espectro IR obtenido del extracto acuoso fracción I de las hojas de *M. grandiflora*.

Análisis por Espectrofotometría Ultravioleta y Visible

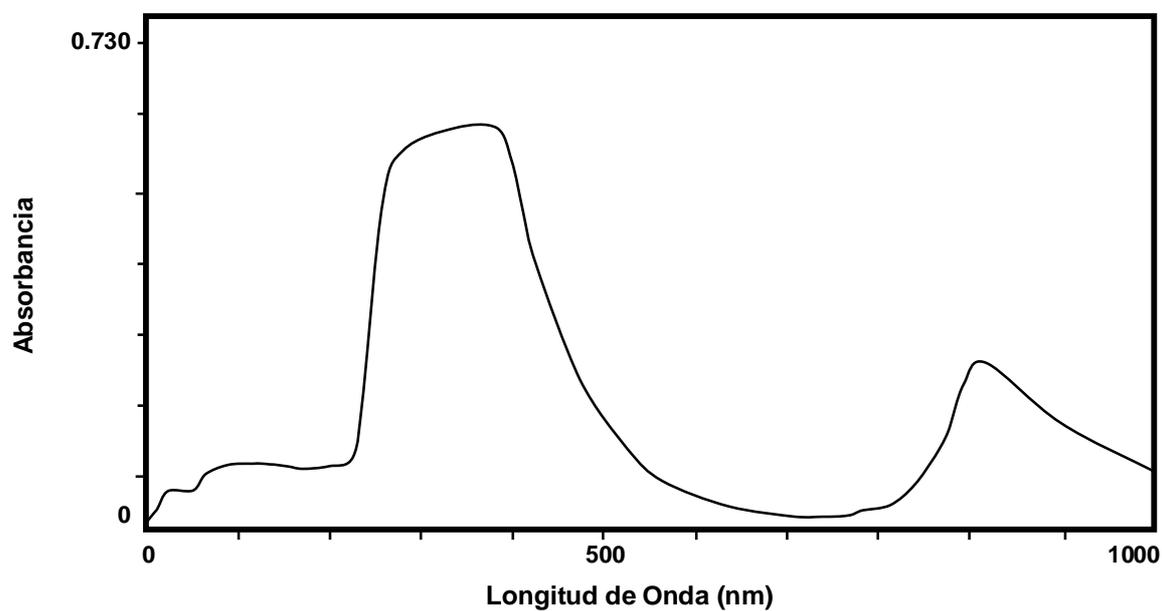


Figura 11. Espectro UV obtenido del extracto crudo de las hojas de *M. grandiflora*.

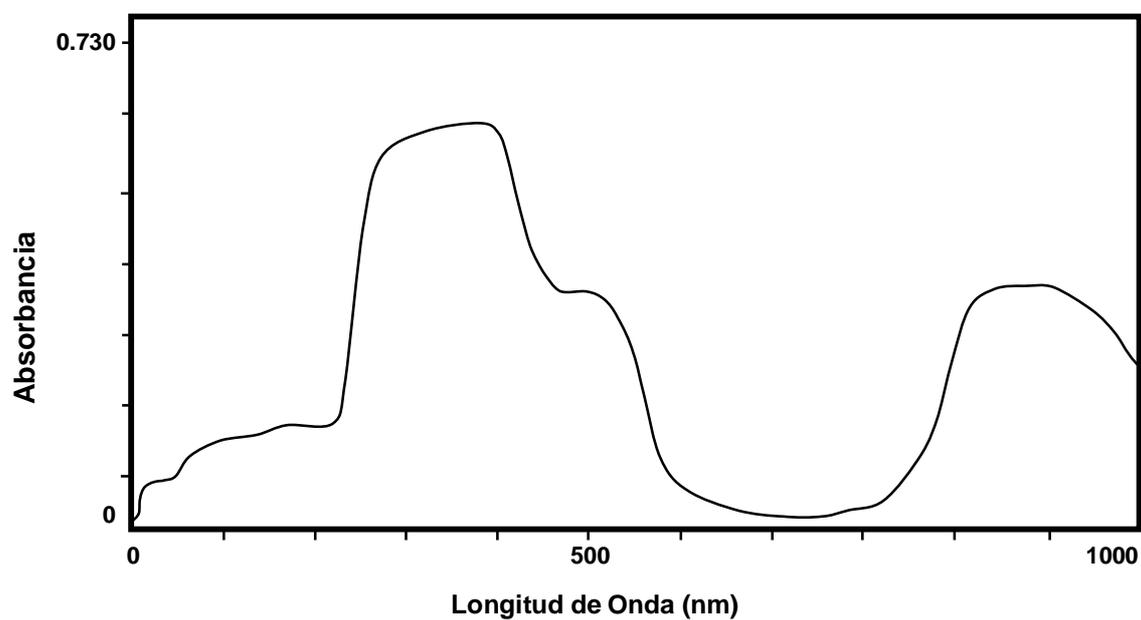


Figura 12. Espectro UV obtenido del extracto crudo más marcador de aminas aromáticas de las hojas de *M. grandiflora*.

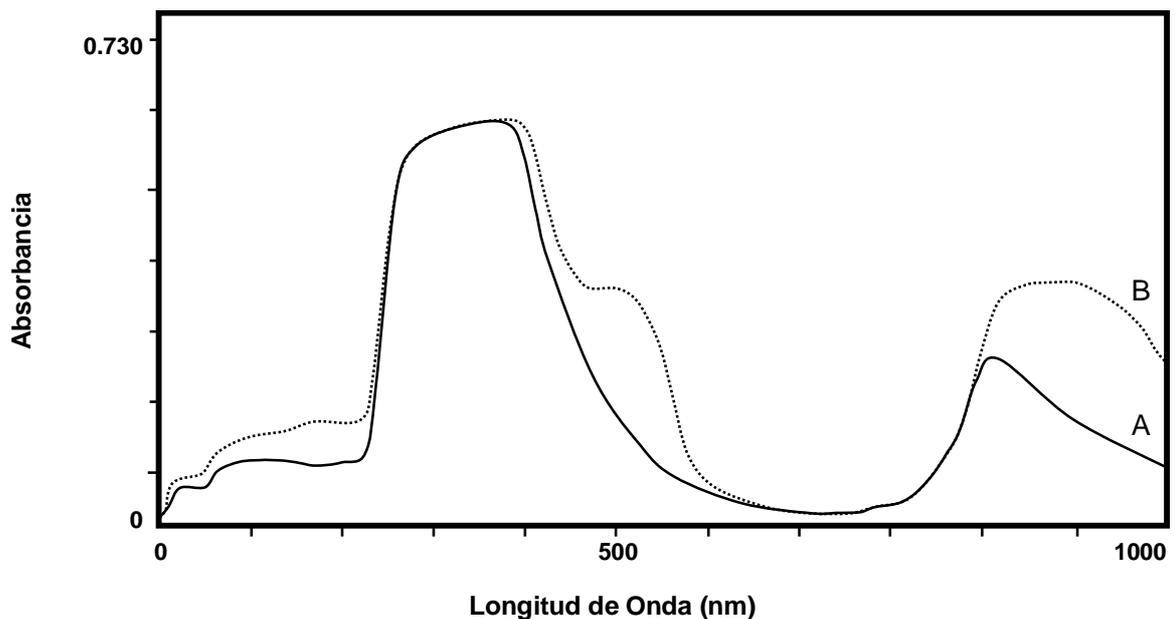


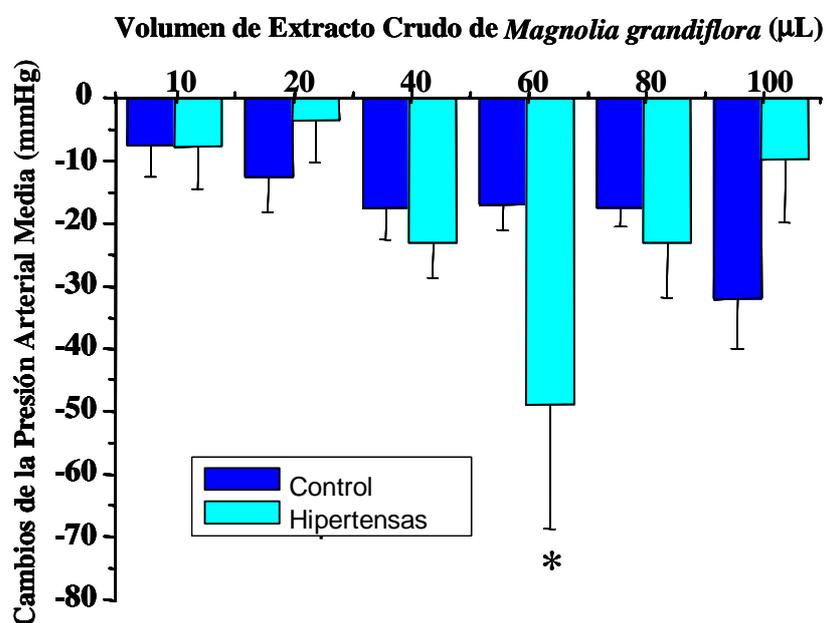
Figura 13. Superposición de los espectros UV obtenidos del extracto crudo y del mismo extracto crudo
 A) más marcador de aminas aromáticas
 B) de las hojas de *M. grandiflora*.

RESULTADOS FARMACOLÓGICOS

Desarrollo de la Hipertensión Arterial.

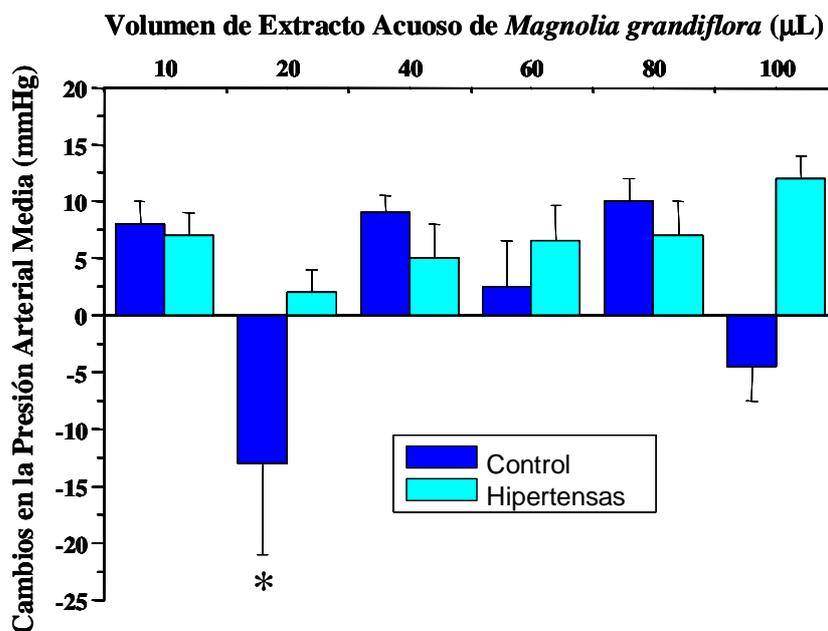
Veintiocho días después de la coartación aórtica abdominal a ratas Wistar macho, se produjeron cambios macroscópicos a nivel renal en el caso de las ratas ligadas. El riñón que se ubicó por debajo de la ligadura (izquierdo) se tornó isquémico, de color amarillo y redujó visiblemente su tamaño, a diferencia del riñón que se ubicó por encima de la ligadura (derecho) que se tornó hipertrófico, evidenciándose por un aumento de tamaño. La ligadura de la aorta produjo un aumento significativo de la presión arterial media en ratas ligadas (161.5 ± 7 mmHg) en comparación con las ratas falsamente ligadas en las cuales no hubo aumento (88 ± 3 mmHg) ni cambios a nivel renal.

La administración intravenosa de diferentes volúmenes (10, 20, 40, 60, 80 y 100µL) del extracto crudo de *M. grandiflora* produjo disminución en la presión arterial media de ratas control (normotensas) y ratas con coartación aórtica (hipertensas). El efecto hipotensor fue semejante en ambos grupos experimentales con 10, 20, 40 y 80 µL del extracto, y fué notablemente mayor en las ratas con hipertensión arterial ($p < 0.05$).



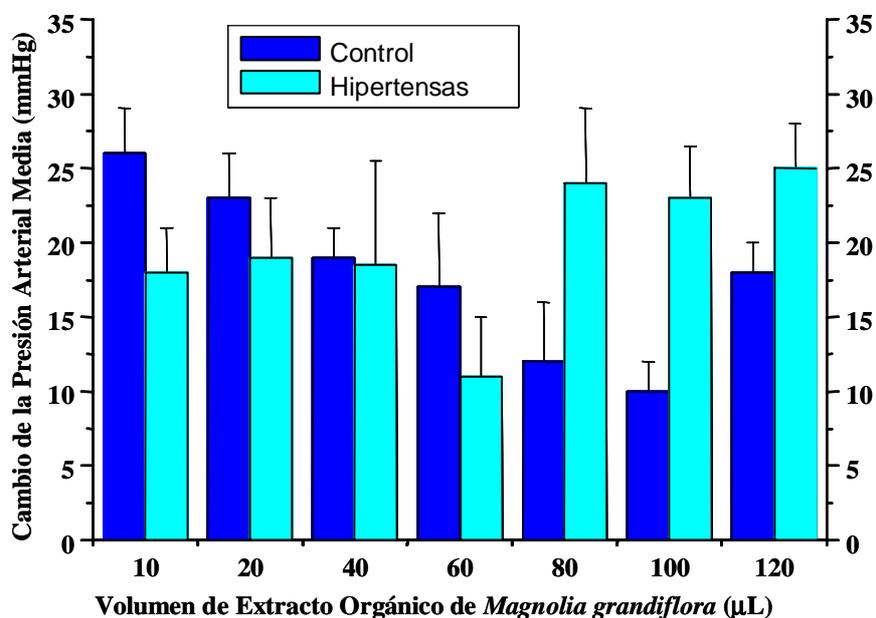
Gráfica 1. Efecto del extracto crudo de *Magnolia grandiflora* sobre la presión arterial. Las barras que representan el promedio de 5 experimentos \pm e.s.

La administración intravenosa de diferentes volúmenes (10, 20, 40, 60, 80 y 100 μL) del extracto acuoso de *M. grandiflora* produjo cambios en la presión arterial media de ratas control (normotensas) y ratas con coartación aórtica (hipertensas). En las ratas control pudimos observar un efecto hipertensor con la dosis administrada en 10, 40, 60 y 80 μL , mientras que en la administración de 20 y 100 μL produjeron disminución de la presión arterial. El efecto producido en las ratas hipertensas fue invariablemente hipertensor a todas las dosis administradas.



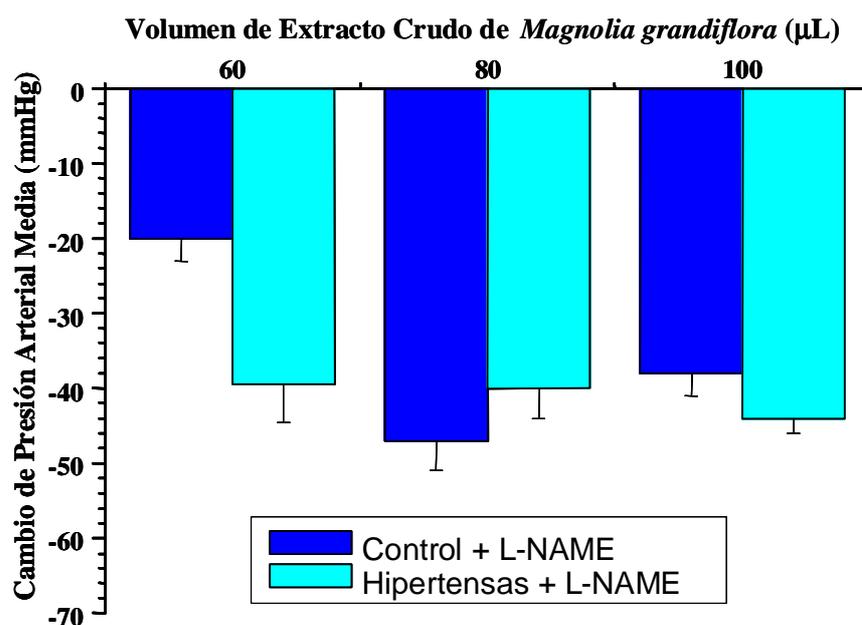
Gráfica 2. Efecto del extracto acuoso fracción I de *Magnolia grandiflora* sobre la presión arterial. Las barras que representan el promedio de 5 experimentos \pm e.s.

La administración intravenosa de diferentes volúmenes (10, 20, 40, 60, 80 y 100 μL) del extracto orgánico de *M. grandiflora* produjo un aumento en la presión arterial media de ratas control (normotensas) y ratas con coartación aórtica (hipertensas). El efecto se presentó en forma independiente de la dosis recibida.



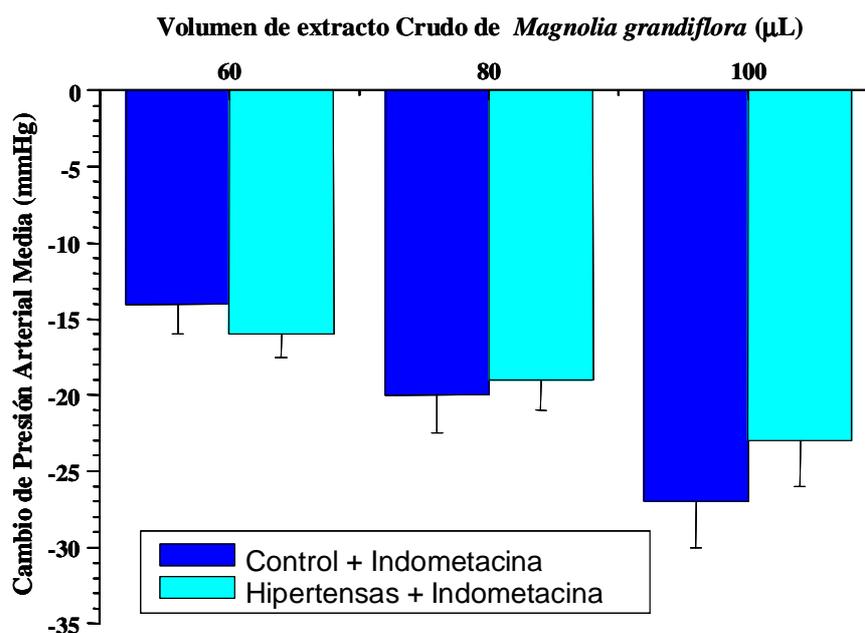
Gráfica 3. Efecto del extracto orgánico de *Magnolia grandiflora* sobre la presión arterial. Las barras representan el promedio de 5 experimentos \pm e.s.

A fin de explorar el mecanismo por el cual el extracto crudo de *M. grandiflora* produjo disminución de la presión arterial, llevamos a cabo su evaluación en presencia de un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, el metil ester de nitro-L-arginina (*L*-NAME). La administración intravenosa de 60, 80 y 100 μ L del extracto crudo de *M. grandiflora* produjo disminución en la presión arterial media de ratas control (normotensas) y ratas con coartación aórtica (hipertensas) aún en presencia del *L*-NAME. Lo cual sugiere que el efecto hipotensor es independiente de un efecto vasorrelajante mediado por óxido nítrico ($p < 0.05$).



Gráfica 4. Efecto del *L*-NAME y del extracto crudo de *Magnolia grandiflora* sobre la presión arterial. Las barras que representan el promedio de 5 experimentos \pm e.s.

A fin de explorar otro mecanismo por el cual el extracto crudo de *M. grandiflora* produjo disminución de la presión arterial, llevamos a cabo su evaluación en presencia de un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, la Indometacina. La administración intravenosa del extracto crudo de *M. grandiflora* (60, 80 y 100 μL) produjo disminución en la presión arterial media de ratas control (normotensas) y ratas con coartación aórtica (hipertensas) aún en presencia de Indometacina. Lo cual sugiere que el efecto hipotensor es independiente de un efecto vasorrelajante mediado por prostaglandinas ($p < 0.05$).



Gráfica 5. Efecto de la Indometacina y del extracto crudo de *Magnolia grandiflora* sobre la presión arterial. Las barras que representan el promedio de 5 experimentos \pm e.s.

CONCLUSIONES

Los principios activos contenidos en el extracto crudo de las hojas de *Magnolia grandiflora* tienen capacidad hipotensora. Este efecto es exclusivo del extracto crudo ya que, la administración de los extractos orgánico y de la fracción del extracto acuoso, produjo un efecto hipertensor.

El mecanismo hipotensor ejercido por los componentes del extracto crudo en las ratas normotensas e hipertensas es independiente de la participación de prostaglandinas relajantes y de la participación del óxido nítrico.

Aunque se pueden identificar, en el extracto crudo, candidatos a mediar el efecto hipotensor (vulgarenol, 2-p-hidroxifenil-2-hidroxi-etilamina y magnograndiólido) es necesario llevar a cabo pruebas farmacológicas que nos permitan identificar inequívocamente la naturaleza del principio activo responsable.

PROPUESTAS

- Dar continuidad con el estudio de esta tesis, ya que falta conocer la concentración de principios activos presentes en los extractos obtenidos de las hojas de *Magnolia grandiflora*, así como también, evaluar farmacológicamente principios activos en forma específica.
- Separar y analizar los compuestos de interés mediante estudios de espectroscopia de masas y resonancia magnética nuclear, junto con la reactividad selectiva, estudios cristalográficos, etc, para conocer la naturaleza química de los principios activos que proporcionan el efecto farmacológico deseado.
- Es importante diseñar un método de preservación de las hojas para evitar un posible deterioro de sus componentes activos, tal vez prensado y deshidratación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Velásquez MO, Rosas PM, Lara EA, Pastelín HG, Grupo ENSA 2000, Sánchez CC, Attie F y Tapía CR: Prevalencia e interrelación de enfermedades crónicas no transmisibles y factores de riesgo cardiovascular en México: Resultados finales de la Encuesta Nacional de salud (ENSA) 2000. Arch Cardiol Mex 2003; 73:62-77.
2. Rosas M, Pastelín HG, Martínez RJ, Herrera AJ y Attie F: Hipertensión Arterial en México, Guías y recomendaciones para su detección, control y tratamiento. Arch Cardiol Mex 2004; 74:134-157.
3. Fitoterapia Básica para corazón y aparato circulatorio: <http://personal.Redestb.es/martin/>
4. Sánchez TG: Hipertensión Arterial Sistémica de su impacto poblacional a las viscosidades terapéuticas. Preludios del XVIII Congreso Nacional de Cardiología, Veracruz, Ver. Méx. 1993; 65-72.
5. Meaney E. Control Fisiológico de la Presión Arterial Sistémica. En: Meaney E. Editor. Hipertensión Arterial Sistémica. Tomo I. México D.F., 1991, p. 10-22.
6. Carretero OA, Scicli AG: Local hormonal factors (intracrine, autocrine, and paracrine) in hypertension. Hypertension 1991;18(suppl 1):1-58.
7. Guyton AC: Blood pressure control-special role of the kidneys and body fluids. Science 1991;252:1813.
8. Guyton AC, Manning RA, Normon RA: Current concepts and perspectives of renal volume regulation in relationship to hypertension. J Hypertens 1986;4(suppl 4):S49
9. Guyton AC, Hall JE, Coleman TG: The dominant role of the kidney in longterm arterial pressure regulation in normal and hypertensive states in Laragh JH, Brenner BM (eds): Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Manegament, ed 2. New York, Raven Press, 1995, p. 1311, 114.
10. Navar LG: Regulation of body fluid balance. In Staub NC, Taylor AE (eds): Edema. New York, Raven Press, 1984, p. 319, 171.
11. Vari RC, Navar LG: Normal regulation of arterial pressure. In Jacobson HR, Striker

- GE, Klahr GE (eds): Principles and Practice of Nephrology, 2nd edn. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995, p. 354.
12. Folkow B: Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev.* 1982;62: 347-504.
 13. Guyton AC, Hall JE, Coleman TG, Manning RD Jr: The dominant role of kidneys in the long-term regulation of arterial pressure in normal and hypertensive states. *Hypertension: Pathology, Diagnosis and Management*, Ed. Laragh JH and Brenner BM, New York, Raven Press, 1990, p. 1029-1052.
 14. Dickinson CJ: Cerebral oxidative metabolism in hypertension. *Clin Sci* 1996; 91:539.
 15. Ferrario CM: The renin-angiotensin system: Importance in physiology and pathology. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;15(suppl 3):S1.
 16. Julius S, Nesbitt S: Sympathetic overactivity in hypertension: A moving target. *Am J Hypertens* 1996;9:113S.
 17. Oparil S, Chen YF, Berecek KH: The role of the central nervous system in hypertension. In Laragh JH, Brenner BM (eds): *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*, 2nd edn. New York, Raven Press, 1995, p. 713, 153.
 18. Saruta T, Kumagai H: The sympathetic nervous system in hypertension and renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996;5:72.
 19. Victor RG, Mark AL: The sympathetic nervous system in human hypertension. In Laragh JH, Brenner BM(eds): *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, 2nd edn. New York, Raven Press, 1995, p. 863.
 20. Dibona GF, Herman PJ, Sawin LL: Neural control of renal function in edema-forming states. *Am J Physiol* 1988; 254(Regul Integr Comp Physiol 23):R1017.
 21. Person PB: Modulation of cardiovascular control mechanism and their interaction. *Physiol Rev* 1996;76:193.
 22. Peterson TV, Benjamin BA: The heart and control of renal excretion: Neural and endocrine mechanisms, 1992;FASEB J 6:2923.
 23. Griending KK, Alexander RW: Endothelial control of the cardiovascular system: Recent advances, 1996;FASEB J 10:283.
 24. Lancaster JR Jr: Nitric Oxide in cells. *Am Sci* 1992;80:248.

25. Raij L, Baylis C: Glomerular actions of nitric oxide. *Kidney* 1995;Int 48:2.
26. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373.
27. Norman M. Kaplan, M.D. Manejo de la hipertensión, 3a ed, Hoechst, Dallas Texas, 1990, p. 15.
28. Navar LG: Renovascular hipertensión: Fisiopatología. Hipertensión Primaria, editado por Izzo JL and Black HR, American Heart Association, 1993, p. 99-101.
29. Desmond G. Julian: Cardiología, editorial Doyma, España, 1990, p. 271-279.
30. Sleight P: Arterial baroreceptores and hypertension. London: Oxford Univ. Press, 1980.
31. Lüscher TF, Dubey RK: Endothelium and platelet-derived vasoactive substances: Role in the regulation of vascular tone and growth. In Laragh JH, Brenner BM (eds): Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management, 2nd edn. New York, Raven Press, 1995, p. 609.
32. Dinko Susic: Clínicas médicas de Norteamérica, 1980;11 (2):1225-1227.
33. Rees D, Ben-Ishay D, Moncada S: Nitric oxide and the regulation of blood pressure in the hypertension-prone and hypertension-resistant sabra rat. *Hypertension* 1996;28:367.
34. Romero JC, Lahera V, Salom MG: Role of the endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. *J Am Soc Nephrol* 1992;2:1371.
35. Ruilope LM, Lahera V, Rodicio JL: Participation of nitric oxide in the regulation of renal function: Possible role in the genesis of arterial hypertension. *J Hypertens* 1994;12:625.
36. Dominiczak AF, Bohr DF: Nitric oxide and its putative role in hypertension. *Hypertension* 1995;25:1202.
37. Marshall JJ, Kontos HA: Endothelium-derived relaxing factors-a perspective from in vivo data. *Hypertension* 1990;16:371.
38. Khoury S. Izzo JL Jr: Affective disorders and hypertension. Hipertensión Primaria editado por Izzo JL y Black HR, American Heart Association, 1993, p. 113-114.
39. Weinstein MC: Estrogens use in postmenopausal women-costs, risks and benefits. N

- Engl J Med 1980;303:308-316.
40. Weinberger MH: Estrogens and hipertension. Compr Ther 1982; 8:71-75.
 41. Freis ED, Wanko A, Wilson IM: Chlorothiazide in hypertensive and normotensive subjects. Ann N Y Acad Sci 1958;71:450-455.
 42. Wilson IM, Freis ED: Relationship between plasma and extracellular fluid volume depletion and the antihypertensive effect of chlorothiazide. Circulation 1959;20:1028-1036.
 43. Freis MD: Estado actual de los diuréticos, bloqueadores β , α y α - β en el tratamiento de la hipertensión. Clínicas Médicas de Norteamérica, 1997, Vol. 2, p. 1291-1301.
 44. Cruickshank JM, Prichard BNC: Beta-blockers in Clinical Practice. London, Churchill Livingstone, 1988.
 45. Fitzgerald JD, Ruffin R, Smedstad R: Studies on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of atenolol in man. Eur J Clin Pharmacol 1978;13:81-89.
 46. Lund-Johansen P: The pharmacology of combined α -and- β -blockers: II: Hemodynamic effects of labetalol. Drugs 1984;28 (suppl 2):35-50.
 47. McDevitt DG, Brown HC, Carruthers SG: Influence of intrinsic sympathetropic activity and cardio-selectivity on beta-adrenoreceptor blockade. Clin Pharmacol Ther 1977;21:356-366.
 48. Lund-Johansen P: Relationship between cardiovascular hemodynamics and goals of antihypertensive therapy. J Hum Hypertens 1993;7 (Suppl 1):S21-S-28.
 49. Braunwald E: Mechanism of action of calcium-channel-blocking agents. N Engl J Med 1982;307:1618.
 50. Ray W, Gifford, Jr: Terapia antihipertensiva: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas de los receptores de angiotensina II y antagonistas de calcio. Clínicas Médicas de Norteamérica. 1997, Vol 2, p. 1303-1315.
 51. Reisin E: Métodos no farmacológicos de la hipertensión, consideraciones sobre peso, sodio, alcohol, ejercicio y tabaco. Clínicas Médicas de Norteamérica 1997, Vol 2, p. 1277-1289.
 52. Pérez CR, Roca J: Contribución al estudio de la Farmacología de la Yolloxóchitl (*Taulama Mexicana*). Arch Latinamer Cardiol Hematol 1937; VII: 87-92.

53. Pérez CR, Roca J: Acción sobre el trabajo del corazón y sobre la circulación coronaria de los extractos acuosos de hojas de Yolloxóchitl (*Taulama Mexicana*). Arch. Latinamer Cardiol Hematol 1938; VIII: 109-115.
54. Mellado V, Chávez SMA, Lozoya X: Phamacological screenig of the aqueous extracts of *Magnolia grandiflora* L. Arch Invest Med 1980; 11:335-346.
55. Linneo C: Sistema naturae. 10a ed. Londres, 1759, Vol.2, p. 1082-1090.
56. Del Valle ML, Tenorio LAT, Torres NJC, Olvera ZG, Pastelín HG: Estudio de los extractos de *Magnolia grandiflora* sobre el músculo cardíaco de cobayo. Arch Cardiol Mex 2004; 74:2:108-117.
57. Krieger L: Indigenous folk botany. Nederland. Time-Life International, 1965. p 45-62.
58. Kelly I: Folk practices in North Mexico. In: Latin American Monographs. No.2, Institute of Latin American Studies. The University of Texas, Texas. 1965, p 84-90.
59. Matsutani H, Shiba T: Tyramine from magnolia species. Phytochemistry 1975;14: 1132-1140.
60. Rao K. V.: Glycosides of *Magnolia grandiflora*. Planta Med 1975;27:31.
61. Weidhophf, R. et al.: Tumor inhibitory agent from *Magnolia grandiflora*. J Pharm Sci 1973;6: 62-345.
62. Fujita M, Itokawa H, Sashida Y: Studies on the components of *Magnolia obovata* Thunb; II. On the components of methanol extract of the bark. Yakugaku Zasshi 1973;93:424-428.
63. Rao KV, Davis TL: Constituents of *Magnolia grandiflora* L: Mono-*o*-methylhonokiol. Planta Med 1982;45(1):57-59.
64. Feraly EI, Farouk S, Wen-Shyong L,. Phenolic constituents of *Magnolia grandiflora* L. seeds. Lloydia 1978;41(5):442-449.
65. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC: The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev 2000; 52:673-751.
66. Nady WT: Medical experimental. 3rd edn. Oxford University Press, New York, 1990, p. 34-99.
67. Hissa R, George C, Stevens ED, Sarela S: Thermoregulatory response to tyramine

- in the pigeon. *Acta Physiol Scand* 1980;110:175-180.
68. Döring H, Dehnert H: The isolated perfused heart according to Langendorff. Friburgo de Brisgovia, Biomesstechnik-Verlag, 1988, p 1-70.
 69. Lozoya X: Mexican medicinal plants used for treatment of cardiovascular diseases. *Am J Chin Med* 1980;8(1): 86-95.
 70. Heinrich M, Barnes J, Gibbons S and Williamson ME: *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, Churchill Livingstone, 2004, p.106-128.
 71. Valcárcel CM, Gómez HA: *Técnicas analíticas de separación*. Reverté, España 1994, p. 333-345,389-427.
 72. Abbott D, Andrews RS: *Introducción a la cromatografía*, 3a ed. Alambra, España, 1983, p.32-37.
 73. Skoog DA: *Principios de análisis instrumental*, 5a ed. Mc Graw Hill, España 2001, p. 172-185, 731-754 y 785-829.
 74. Calderón MJ, Avendaño RR: *Espectroscopia infrarroja*, 1a ed. Alambra, España, 1979, p. 1-26.
 75. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*, 7a ed. Secretaria de Salud, México, 2000, p. 226-237,263.
 76. Willard HH, Lynne LM: *Métodos instrumentales de análisis*, 1a ed. Iberoamerica, 1996, p. 279,280,505,569.
 77. Kiwalth R and Kimari O: *Infrared of Spectroscopy*; 2nd edn. D'Evan Nostrand. Simmers Public; New York, 1988.
 78. Silverstein MR, Glayton BG: *Spectrometric identification of organic compounds*, 3rd edn, John Wiley&Sons, Inc., USA: 1974.
 79. Cheng KL: Ultraviolet and visible absorption spectroscopy. In Bauer, H.H., Christian, GD, O'Reilly, JE: *Instrumental Analysis*. Allyn and Bacon. Boston, 1978, p. 154-200.
 80. Ewing, G.W. *Instrumental Methods of Chemical Analysis*. 2nd edn. McGraw-Hill. New York, 1980, p. 15-74.
 81. Fernández M, Onesti G, Weder A, Dykyj R, Gould AB, Kim KE, Swartz C: Experimental model of severe renal hipertensión. *J Lab Clin Med* 1979;67:561-567.

82. Ganong WF: Hemodinámica y flujo plasmático. En: Fisiología médica, 14^a ed. Manual Moderno, 1993.
83. Darmstadt: Reactivos Merck. Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel, Merck, (R.F. de Alemania), 1998.
84. Feigl F and Anfer V: Prueba a la gota en análisis orgánico, 7a ed. El Manual Moderno, México, 1980.
85. Calvo VCG: La atención del paciente con hipertensión arterial. Biblioteca Médica Mexicana. ALFIL México, 1999, p. 15-53.8.
86. Artiago R: Control de factores de riesgo en los programas de rehabilitación cardiaca. España, Rev Esp de Cardiol 1995;48(suplemento 1):13-32.9.
87. Stripping A: The barriers to a healthy heart. Grundy Lane, 1997, p. 1-15.
88. Whalen EJ, Johnson AK, Lewis: Effects of nitric oxide synthase inhibition on sympathetically mediated tachicardia. Eur J Pharmacol 1999;365(2-3): 217-223.
89. Valérie B. Schini and Paul M. Vanhoutte: *L*-Arginine evokes both endothelium-dependent and –independent relaxations in *L*-Arginine-depleted aortas of the rat. Circ Res 1991;68(1):209-216.