

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE LA INFUSIÓN Y DEL  
EXTRACTO HEXÁNICO DE LAS HOJAS DE  
*Prunus serotina* Ehrh.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
P R E S E N T A :  
MARTÍNEZ VALDEZ ANGÉLICA

MÉXICO, D.F. 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág</b>
<b>Lista de Cuadros</b>	III
<b>Lista de Figuras</b>	IV
<b>Lista de Esquemas</b>	IV
<b>Lista de Abreviaturas</b>	V
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	4
2.1 Incidencia de enfermedades cardiovasculares en México.	4
2.2 Fisiología de los vasos sanguíneos.	5
2.3 Endotelio vascular.	7
2.4 Sustancias vasodilatadoras derivadas del endotelio.	10
2.4.1 Óxido nítrico.	11
2.4.2 Factor hiperpolarizante derivado del endotelio.	13
2.4.3 Endotelina.	14
2.4.4 Prostaciclinas.	15
2.4.5 Músculo liso.	15
2.4.6 Contracción dependiente del endotelio.	16
2.5 Antecedentes botánicos y etnobotánicos de la especie <i>Prunus serotina</i> .	18
2.5.1 Descripción, nombres comunes y distribución geográfica de la especie <i>P. serotina</i> .	18
2.5.2 Usos.	19
2.5.3 Antecedentes químicos de <i>Prunus serotina</i> .	21
<b>3. OBJETIVOS</b>	27

<b>4.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	28
4.1	Procedimientos generales.	28
4.1.1	Análisis cromatográficos.	28
4.1.2	Equipos utilizados para la determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	29
4.1.3	Material vegetal.	30
4.2	Ensayos biológicos.	30
4.2.1	Evaluación de la actividad relajante en músculo liso de aorta aislada de rata.	30
4.3	Estudio fitoquímico de <i>Prunus serotina</i> .	32
4.3.1	Preparación y fraccionamiento de la infusión a partir de las hojas de <i>Prunus serotina</i> .	32
4.3.2	Fraccionamiento secundario de la fracción <b>FAc</b> obtenida.	33
4.3.3	Aislamiento de la hiperina a partir de la fracción secundaria <b>FAc-3</b> .	34
4.3.4	Aislamiento de la prunina a partir de la fracción <b>FAc-4</b> .	35
4.3.5	Preparación del aceite esencial de las hojas de <i>Prunus serotina</i> .	37
4.3.6	Obtención del extracto total a partir de las hojas de capulín.	37
4.3.6.1	Fraccionamiento primario del extracto total de las hojas de <i>P. serotina</i> .	37
4.3.6.2	Fraccionamiento secundario de la fracción hexánica.	38
4.3.6.3	Aislamiento del ácido ursólico a partir de la fracción <b>F-D5</b> .	40
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	41
<b>6.</b>	<b>RESUMEN Y CONCLUSIONES</b>	49
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	50
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	51
<b>9.</b>	<b>APÉNDICE</b>	63

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Pág
1.	Sustancias producidas por el endotelio vascular.	9
2.	Metabolitos secundarios obtenidos de la especie <i>Prunus serotina</i> .	22
3.	Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa delgada.	28
4.	Descripción de las fracciones obtenidas del fraccionamiento primario de la infusión de las hojas de <i>Prunus serotina</i> .	33
5.	Resumen del fraccionamiento secundario de la fracción <b>FAc</b> .	33
6.	Resumen del fraccionamiento terciario por cromatografía en columna de gel de sílice C <sub>18</sub> de la fracción <b>FAc-4</b> secundaria.	35
7.	Resumen del fraccionamiento secundario del extracto hexánico por cromatografía en columna al vacío de gel de sílice.	39
8.	Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción <b>F-D</b> por cromatografía en columna.	39
9.	Resumen del fraccionamiento de la muestra <b>FD5-I</b> , utilizando una columna de gel de sílice C <sub>18</sub> .	40
10.	Compuestos aislados de <i>Prunus serotina</i> .	44
11.	Efecto relajante de los compuestos aislados sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta intactos.	45
12.	Constituyentes del aceite esencial de las hojas de <i>Prunus serotina</i> .	48

## LISTA DE FIGURAS

<b>Esquema</b>	<b>Contenido</b>	<b>Pág</b>
Figura 1	Principales causas de muerte general en México en el periodo 2002-2006.	5
Figura 2	Capas que conforman venas y arterias.	7
Figura 3	Efectos del oxido nítrico sobre el músculo liso vascular.	12
Figura 4	<i>Prunus serotina</i> Ehrh. sp. <i>capuli</i> (Hojas)	19
Figura 5	Estructura de la hiperina.	34
Figura 6	Estructura de la prunina.	36
Figura 7.	Efecto sobre la musculatura lisa arterial del extracto total y fracciones de <i>Prunus. serotina</i> .	42
Figura 8	Curva concentración respuesta del efecto relajante de la fracción hexánica de <i>P. serotina</i> .	43
Figura 9	Comparación de las curvas concentración respuesta del efecto relajante de la quercetina, hiperina y prunina en segmentos de aorta intactos de rata.	46
Figura 10	Cromatograma de gases obtenido del aceite esencial de las hojas de <i>P. serotina</i> .	47

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema</b>	<b>Contenido</b>	<b>Pág</b>
1.	Fraccionamiento preliminar de la infusión de las hojas de <i>Prunus serotina</i> .	32
2.	Extracción y fraccionamiento preliminar del extracto total de las hojas de <i>P. serotina</i> .	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	concentración de calcio intracelular
°C	grados Celsius
AcOEt	acetato de etilo
AMPc	adenosin monofosfato ciclico
CaCl <sub>2</sub>	cloruro de calcio
CaM	calmodulina
CD <sub>3</sub> OD	metanol deuterado
CE <sub>50</sub>	concentración efectiva media
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diclorometano
cm	centímetro
d	doble
dd	doble de doble
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMSO	dimetil sulfóxido
EDCF	Factor de contracción derivado del endotelio
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDRF	Factor relajante derivado del endotelio
Emáx	Efecto máximo
NOSe	óxido nítrico sintasa endotelial
ET	endotelina
eV	electrón volts
FAB <sup>+</sup>	bombardeo rápido de átomos modalidad positiva
g	gramo
GMPc	guanilato ciclasa monofosfato
HAS	hipertensión arterial sistémica
ICAM	molécula de adhesión intramolecular
IL	interleucina
NOSi	óxido nítrico sintasa inducible
IR	infrarrojo
J	constante de acoplamiento
KCl	cloruro de potasio
Kg	kilogramo
LDL	lipoproteína de baja densidad
m	multiplete
m/z	relación masa-carga
M <sup>+</sup>	ion molecular
m <sup>2</sup>	metro cuadrado
MeOH	metanol
mg	miligramos
MgCl <sub>2</sub>	cloruro de magnesio
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
MHz	megaHertz

## LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)

Abreviatura	Significado
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetro
mM	milimolar
N <sub>2</sub>	nitrógeno
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato diácido de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sodio
nM	nanomolar
nNOS	óxido nítrico sintasa neuronal
NO	óxido nítrico
NO <sup>+</sup>	ion nitrosonio
NO <sup>·</sup>	radical libre del óxido nítrico
NO <sub>i</sub>	ion nitroxi
NOS	enzima endotelial óxido nítrico sintasa
O <sub>2</sub>	oxígeno
ONOO-	ion peróxinitrito
p.f	punto de fusión
PAI	inhibidor del activador de plasminógeno
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG	prostaglandina
PK	proteína cinasa
ppm	partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
RS	retículo sarcoplásmico
s	singulete
GCs	guanilato ciclasa soluble
SINAIS	Sistema Nacional de Información de Salud
SSA	Secretaría de Salud
SSP	Secretaría de Salud Pública.
TGF	factor de transformación
t-PA	activador tisular de plasminógeno
Tx	tromboxano
UV	ultravioleta
VCAM	molécula de adhesión de la célula vascular
µg	microgramos
µM	micromolar

## 1. INTRODUCCIÓN

Todos los pueblos del mundo han usado a las plantas medicinales para atender sus problemas de salud y la gran mayoría de los países desarrollados y en vías de desarrollo siguen haciendo uso de ellas (INI, 1994). Desde sus orígenes, la humanidad ha buscado en las plantas una alternativa para tratar aquellos padecimientos que la aquejan, plantas cuyas propiedades terapéuticas han sentado las bases de la medicina empírica, la que se ha mantenido durante siglos sin que los conocimientos científicos modernos hayan podido prescindir de ellas (Mitscher *et al.*, 2000; Guasch e Hinostroza, 2005).

Las plantas medicinales son consideradas como el recurso natural más amplio y valioso de la medicina indígena tradicional, las civilizaciones maya y mexica se destacaron por una amplia y profunda sabiduría no sólo en relación con el uso de los vegetales, sino también por su manejo adecuado, eficiente y previsor de las mismas (Rzedowski, 1981; Lozoya, 1993).

Durante el régimen colonial, solo merecen mención el extenso trabajo realizado por Fray Bernardino de Sahún (1529), franciscano de la Nueva España, recopila datos sobre el conocimiento de los indígenas acerca del valor de las plantas medicinales, en sus obras conocidas como “El Códice Florentino” y su versión en español “La Historia General de las cosas de la Nueva España” (Díaz, 1976).

El Códice Badiano (1552) que en realidad debería ser nombrado el “*Libellus de medicinalibus indorum herbis*”, es un libro original del médico indígena Martín de la Cruz, recopila la información acerca de la descripción de los métodos terapéuticos, nombres náhuatl, descripción de sus efectos y formas de aplicación médica de un gran número de plantas (Díaz, 1976; INI, 1994). La versión fue traducida al latín por Juan Badiano y dedicada al hijo de Antonio de Mendoza, Virrey de la Nueva España (Díaz,

1976). Actualmente este código se encuentra en el repositorio de Códices del Museo Nacional de Antropología e Historia (Arqueología Mexicana, 2007).

Posteriormente, la expedición que realizó Francisco Hernández (1570-1577) a la Nueva España permitió explorar de manera sistemática la distribución, efecto y utilidad de las plantas medicinales según su orientación galénica, describiendo en su obra titulada "Historia Natural de la Nueva España" alrededor de 3076 plantas incluyendo sus usos medicinales, dosificación y preparación (Díaz, 1976; Valdés y Flores, 1984; INI, 1994; Romo, 1999).

Un caso de insólita tenacidad y perseverancia es indudablemente el de Maximino Martínez, quien realizó grandes obras compilatorias, como el "Catálogo de nombres científicos y vulgares de plantas mexicanas" (1923) y "Las plantas medicinales de México" (1928 y 1933) (Díaz, 1976; Rzedowski, 1981).

En lo que respecta al uso de plantas con fines curativos, México posee una rica tradición en el empleo de plantas medicinales entre sus variadas prácticas curativas tradicionales o populares. Aproximadamente 62 diferentes grupos étnicos viven en México actualmente, cada uno con su propia cultura, dialecto y repertorio de hierbas medicinales (Martínez, 1989; INI 1994; Linares *et al.*, 1994; Lozoya, 1994; Aguilar, 2001).

En México, se estima que existen alrededor de 30,000 especies de plantas y se calcula que la flora medicinal mexicana contiene entre 3,000 y 5,000 plantas con un potencial terapéutico benéfico e increíblemente sólo el 1% de estas plantas medicinales ha sido estudiada a fondo considerando estas propiedades medicinales potenciales (INI, 1994). De estas especies, se describe un grupo básico de 1000 plantas que han sido empleadas en la medicina tradicional de México durante casi 400 años para el tratamiento de

enfermedades comunes como infecciones respiratorias y de la piel, desordenes gastrointestinales, hipertensión, dolor, diabetes o para inducir el sueño o el parto (Aguilar, 1994; Lozoya, 1994; Bye, 1995; Lozoya, 1999).

Actualmente existe más información sobre los principios activos de las plantas, que en ningún otro momento de la historia, debido a que se ha alcanzado un alto grado de desarrollo y perfeccionamiento, tanto en los procesos de obtención de los constituyentes activos a partir de sus fuentes naturales, como en la biosíntesis e identificación de dichos constituyentes (Mata, 2000).

En este contexto, tomando en cuenta que las enfermedades cardiovasculares se encuentran entre las primeras causas de muerte en México (SSA, 2006), es necesario llevar a cabo mayor investigación sobre plantas con actividad hipotensora, a fin de asegurar que la planta produzca el efecto terapéutico esperado, además de garantizar su inocuidad.

Así el uso de plantas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares en la literatura herbolaria de México describe a las especies *Chiranthodendron penthadactylon*, *Talauma mexicana*, *Prunus serotina* y *Lepechinia caulescens* como agentes potenciales para el tratamiento de esta etiología (INI, 1994; Aguirre-Crespo *et al.*, 2006).

Así, en este marco de referencia se planteó el presente proyecto de investigación que describe el estudio fitoquímico de las hojas de la especie *Prunus serotina* Ehrh.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 INCIDENCIA DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES EN MEXICO

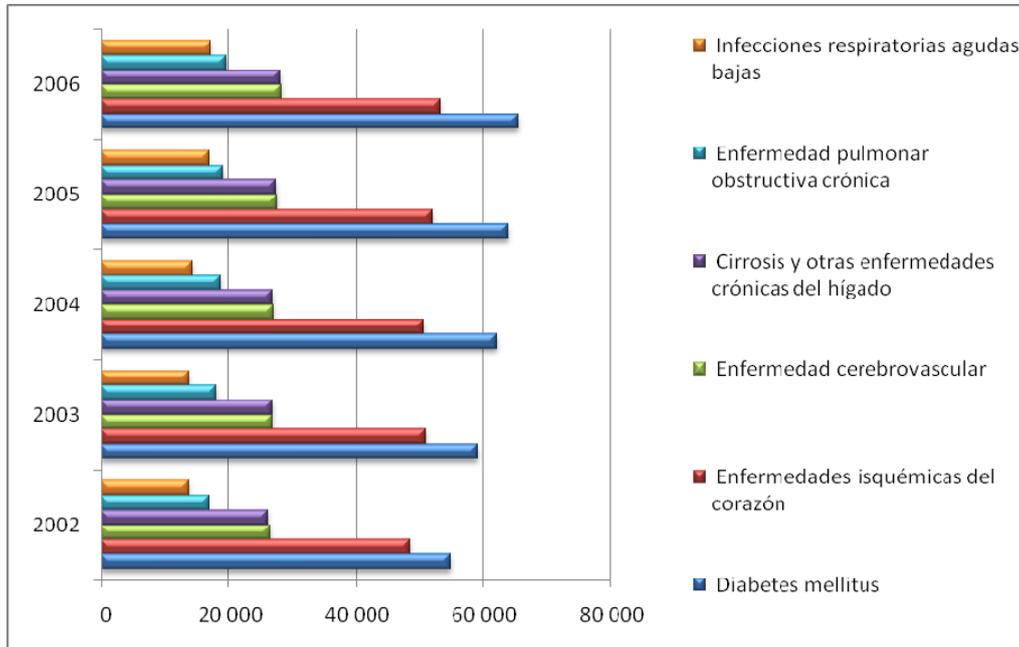
La hipertensión arterial sistémica (HAS) es una de las enfermedades crónicas de mayor incidencia en México; alrededor de 26.6% de la población entre 20 y 69 años de edad la padece, y alrededor del 60% de los individuos afectados desconoce su enfermedad. Esto significa que en nuestro país existen más de trece millones de personas con este padecimiento, de las cuales un poco más de ocho millones no han sido diagnosticadas (NOM-030-SSA2-1999).

La HAS es caracterizada por un incremento en la presión sanguínea y es el principal factor de riesgo para desarrollar insuficiencia de tipo renal, cardíaca y/o endotelial; *diabetes mellitus* (DM), síndrome metabólico y ataques al corazón (Sardana y Madan, 2003; Aguirre-Crespo *et al.*, 2006).

En México, la HAS es uno de los problemas más importantes de salud pública (INEGI/SSA/CONAPO, 2002), la mortalidad por esta complicación muestra un incremento sostenido en las últimas décadas. Así pues, las enfermedades del corazón, la enfermedad cerebro vascular y las nefropatías se encuentran entre las primeras causas de muerte (SSA, 2006).

De acuerdo con la SSA, en 2004 se registraron en nuestro país 101 mil 379 muertes causadas por las enfermedades crónico degenerativas, de las cuales 62 mil 201 correspondieron a la *diabetes mellitus*, que ocupó la primer causa de muerte general en México. Para las enfermedades cerebro-vasculares se registraron 26 mil 975 defunciones, la cual ocupó la tercera posición y por último las enfermedades hipertensivas ocuparon la novena posición con 12 mil 203 defunciones (SSA, 2004).

En la figura 1 se ilustran las diferentes causas de muerte en México en el periodo 2002-2006.



**Figura 1.** Principales causas de muerte en México en el periodo 2002-2006 (SSA, 2006).

## 2.2 FISIOLÓGÍA DE LOS VASOS SANGUÍNEOS.

La pared vascular es un órgano activo, flexible e integrado por componentes celulares, como células endoteliales, musculares lisas y fibroblastos, y componentes no celulares como la matriz extracelular. En forma dinámica, estos componentes modifican su forma, aumentan, disminuyen o se reorganizan, en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos, manteniendo así la integridad del vaso en condiciones fisiológicas o participando en la alteración vascular que aparece en enfermedades como la hipertensión y la arteroesclerosis. La matriz extra celular comprende cuatro grupos de

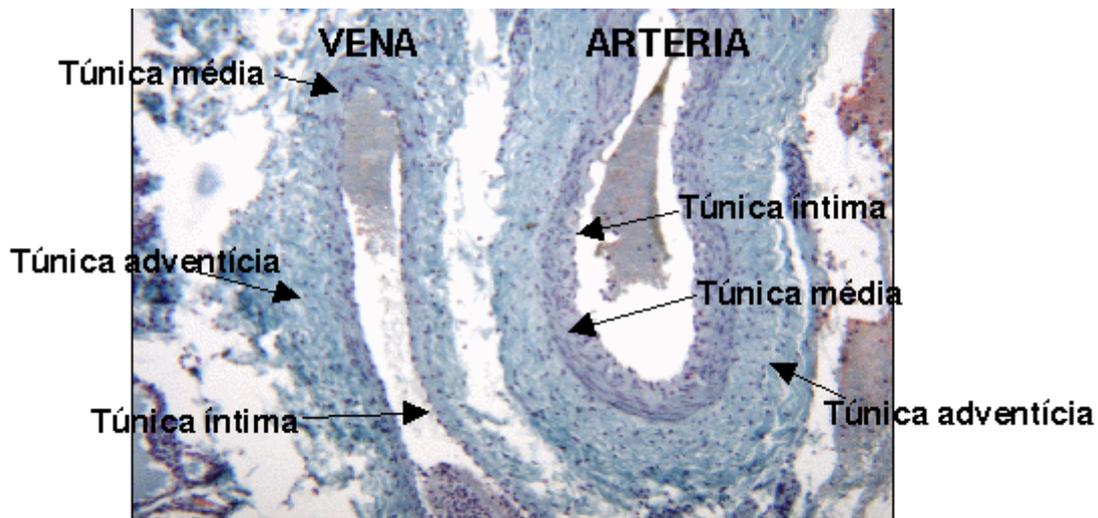
macromoléculas elastina, colágeno, proteoglicanos y glucoproteínas estructurales (fibronectina y laminina) (Risler *et al.*, 2002; Dvorkin y Cardinali, 2003).

Las paredes de arterias, vasos, vénulas y venas contienen músculo liso cuyo estado de contracción está regulado por las hormonas circulantes y los mediadores liberados localmente por terminaciones nerviosas simpáticas y células endoteliales (Rang *et al.*, 2004). Las arterias son tubos flexibles, elásticos y fuertes que resisten presiones muy considerables; contiene gran cantidad de tejido elástico y se componen de tres capas denominadas íntima, media y adventicia (**Figura 2**) (Mulcahy *et al.*, 1984; Dvorkin y Cardinali, 2003).

La capa o túnica íntima de las arterias es muy delgada y lisa, de manera que la sangre no encuentra ningún impedimento para mantener un flujo laminar constante; está constituida por un estrato de células que tapiza la luz del vaso y tiene un revestimiento externo de tejido conectivo denominado subendotelio. El subendotelio está formado por una capa de tejido conectivo compuesto de abundante colágeno y otros materiales extracelulares como elastina, fibronectina, glicosaminoglicanos, tropoespandina y factor de von Willebrand (García y Hurlé, 2005).

La túnica media es fibromuscular y está constituida principalmente por fibras elásticas y fibras musculares lisas; esta capa proporciona a la arteria su fuerza y la capacidad de cambiar la presión o la distribución del flujo mediante su contracción o relajamiento (Mulcahy *et al.*, 1984; García y Hurlé, 2005). Su principal componente es la elastina, que proporciona al vaso la elasticidad necesaria para adaptarse a los cambios de presión originados por el flujo pulsátil del corazón, además tiene una capacidad amortiguadora que permite mantener un flujo sanguíneo continuo (Navarro-Cid *et al.*, 1999). La capa media está separada de la íntima por la lámina elástica interna y de la adventicia por la lámina elástica externa (García y Hurlé, 2005).

La adventicia es la capa más externa que conduce terminaciones nerviosas a la capa media y está constituida por fibroblastos incluidos en una matriz extracelular de grandes haces de fibras de colágeno y una red laxa fibra elástica (Mulcahy *et al.*, 1984; Navarro-Cid *et al.*, 1999; Ganong, 2006).



**Figura 2** Capas que conforman venas y arterias.

### 2.3 ENDOTELIO VASCULAR.

El endotelio vascular es una capa única de células que recubre el interior de los vasos sanguíneos, es un órgano ampliamente distribuido, tiene un peso aproximado de 1.5 kg y una superficie de 400 m<sup>2</sup> (Dvorkin y Cardinali, 2003; Verdejo, 2006).

El endotelio es considerado como un órgano vital endocrino y paracrino, que está profundamente involucrado en múltiples funciones, sintetizando, metabolizando y liberando un número de sustancias biológicamente activas (Bassenge, 1996; Cingolani y Houssay, 2000; Rang *et al.*, 2004; Rojas y Morales, 2004; Verdejo, 2006).

El endotelio es la fuente de numerosos mediadores químicos (**Cuadro 1**) que controlan activamente la contracción del músculo liso subyacente e influye en la función de las

células mono nucleares, además de la acción antiagregante plaquetaria relacionada con el efecto del óxido nítrico (NO), produce prostaciclina, y tiene una acción fibrinolítica relacionada con la síntesis y secreción del activador del plasminógeno tisular (Cingolani y Houssay, 2000; Rang *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2006).

El endotelio intacto es una de las condiciones más importantes para evitar la trombosis arterial, aterosclerosis y la vasoconstricción que se presentan en los síndromes isquémicos agudos. Los factores de riesgo tradicionales de la enfermedad coronaria, que incluyen a los lípidos aumentados, el consumo de tabaco, la HAS, la DM y la edad contribuyen a la presencia de disfunción endotelial. Por lo que es posible que la mayoría de las enfermedades cardiovasculares refleje una disfunción endotelial (Dvorkin y Cardinali, 2003; Verdejo, 2006).

El endotelio normal detecta cambios en distintos factores hemodinámicos (*i.e.* presión y fuerzas de rozamiento) y hormonales (*i.e.* sustancias vasoactivas, así como; mediadores que se producen en las células sanguíneas y plaquetas), sintetiza y libera sustancias biológicamente activas que mantienen la homeostasis vascular (Rang *et al.*, 2004; Verdejo, 2006).

**Cuadro 1** Sustancias producidas por el endotelio.

<b>Sustancias vasoactivas</b>	<b>Moduladores o mediadores del crecimiento</b>	<b>Reguladores de la homeostasis</b>	<b>Moduladores o mediadores de la respuesta inflamatoria</b>
<p><b>Vasodilatadores</b></p> <p>NO EDHF PGI<sub>2</sub> Bradicinina, acetil colina, serotonina, histamina, sustancia P, péptido natriurético tipo C</p> <p><b>Vasoconstrictores</b></p> <p>Endotelina Angiotensina II Tromboxano A<sub>2</sub>, endoperóxidos, Prostaglandina H<sub>2</sub>, Superóxido</p>	<p><b>Promotores de crecimiento</b></p> <p>Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)</p> <p>Factor de crecimiento derivado de fibroblastos (TGFβ)</p> <p>Endotelina 1 (ET-1)</p> <p><b>Inhibidores del crecimiento</b></p> <p>Heparansulfatos</p> <p>Factor de transformación β (TGF-β)</p> <p>NO, PGI<sub>2</sub>,</p>	<p>Heparansulfatos</p> <p>Trombomodulina</p> <p>Activador tisular de plasminógeno (t-PA)</p> <p>Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-I)</p> <p>NO, PGI<sub>2</sub>,</p>	<p>NO</p> <p><b>Moléculas de adhesión</b></p> <p>Selectinas</p> <p>Molécula de adhesión intramolecular (ICAM)</p> <p>Molécula de adhesión de la célula vascular (VCAM)</p> <p><b>Antígenos</b></p> <p>Complejo Principal de Histocompatibilidad II (MHC-II)</p>

Adaptado de Cingolani y Houssay, 2000.

Por medio de sus productos de secreción, el endotelio vascular participa en la regulación del tono y permeabilidad vascular; en la regulación del crecimiento celular vascular; en la contracción y relajación del músculo liso; en la homeostasis y en la trombosis mediante sus funciones antiplaquetarias, anticoagulantes y microfibrillas; en respuestas proliferativas celulares y en mecanismos de defensa como la inflamación a través de la expresión de moléculas quimiotácticas y de adhesión (Rang *et al.*, 2004; Verdejo, 2006).

La función más conocida es el mantenimiento de un tono vascular a través de una dilatación en la proporción exacta para conservar la presión arterial en valores normales y permitir la perfusión tisular (Dvorkin y Cardinali, 2003; Cingolani y Houssay, 2000; Verdejo, 2006). Esta función vasodilatadora la ejerce por medio de la síntesis y

secreción de un factor de relajación que ha sido identificado como óxido nítrico (NO) (Bonaventura *et al.*, 2006).

El endotelio también secreta varios péptidos vasoactivos, incluyendo el vasodilatador péptido nutriurético C, adrenomedulina y endotelina (ET) y sintetiza compuestos vasoconstrictores como endotelina 1 (ET-1), tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) y anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>2-</sup>) (**Cuadro 2**). De ahí su importancia actual en la patogenia de la aterosclerosis, la hipertensión arterial y los trastornos hemodinámicos de la sepsis (Cingolani y Houssay, 2000).

#### **2.4 SUSTANCIAS VASODILATADORAS DERIVADAS DEL ENDOTELIO.**

Las células endoteliales producen al menos tres sustancias que producen relajación del músculo liso vascular, el óxido nítrico, también conocido como factor relajante derivado del endotelio (EDRF), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y la prostaciclina (Cingolani y Houssay, 2000; Kyoung *et al.*, 2006).

De estas sustancias se destaca el NO, ya que juega un papel fisiológico crítico en el mantenimiento de la homeostasis de los vasos sanguíneos, incluyendo la regulación del tono vascular, inhibición de la agregación de plaquetas, mantenimiento del balance entre los procesos de trombosis y fibrinólisis; y regulación en el reclutamiento de células inflamatorias dentro de la pared vascular, en la trombogenesis, además de regular la adhesión de leucocitos y proliferación de las células vasculares del músculo liso (Dvorkin y Cardinali, 2003; Rossini *et al.*, 2003; Yi-Ching *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2006; Bonaventura *et al.*, 2006; Kyoung *et al.*, 2006; Yoffe *et al.*, 2007).

### 2.4.1 ÓXIDO NITRICO.

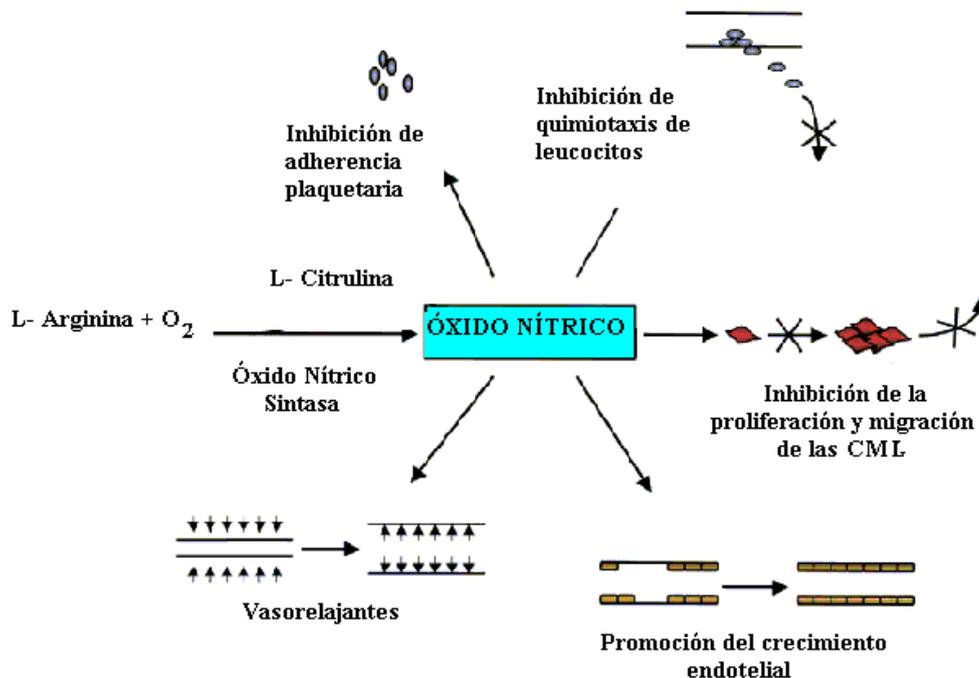
El NO es sintetizado en las células endoteliales y se genera a partir de la conversión del aminoácido L-arginina, por la enzima sintasa de NO endotelial (NOSe) (**Figura 3**) y se difunde hacia las células del músculo liso, en donde produce guanidin monofosfato cíclico (GMPc) por la activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs) y/o por hiperpolarización de la membrana produciendo un incremento de concentraciones de GMPc, éste a su vez; activa la proteína cinasa (dependiente del GMPc), que disminuye las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, causando la relajación del músculo liso y disminuyendo el tono vascular (Moncada *et al.*, 1991; Cingolani y Houssay, 2000; Dvorkin y Cardinali, 2003; Yi-Ching *et al.*, 2005; Aguirre-Crespo *et al.*, 2006; Bonaventura *et al.*, 2006; Ganong, 2006; Xie, *et al.*, 2006; Verdejo, 2006).

El NO formado disminuye la actividad de la enzima por un mecanismo de retroalimentación negativa, de modo que se convierte en un modulador de su propia síntesis. El aumento en la liberación del NO es resultado de la activación de la NOSe debido al aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y tiene como consecuencia fisiológica la regulación rápida del diámetro vascular (Cingolani y Houssay, 2000). El principal factor físico responsable de la liberación del NO por las células endoteliales son las fuerzas de corte sobre la membrana celular o la presión ejercida por la sangre sobre el endotelio vascular (Navarro-Cid *et al.*, 1999; Ganong, 2006).

El NO puede existir en una variedad de formas, como radical libre ( $\text{NO}^\bullet$ ), como el ion nitroxi ( $\text{NOi}$ ), nitrosonio ( $\text{NO}^+$ ) y/o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), la forma que predomina depende de la fuente de NO. El NO es un radical libre que rápidamente reacciona con otras moléculas que contienen electrones no apareados, y puede reaccionar fundamentalmente

con otros radicales libres y con metales de transición, esta alta reactividad explica su corto tiempo de vida, *in vitro* su tiempo de vida es de algunos segundos e *in vivo* es de apenas 0.1 segundos (Barbato y Tzeng, 2004; Bonaventura *et al.*, 2006; Yoffe *et al.*, 2007).

El NO es sintetizado por una familia de enzimas llamadas sintasas del NO (NOS) y se han identificado tres isoformas de NOS en humanos y otros organismos, que son la NOS-neuronal (NOS<sub>n</sub>, también conocida como NOS tipo I), la NOS-inducible (NOS<sub>i</sub>; NOS tipo II) y la NOS-endotelial (NOS<sub>e</sub>; NOS tipo III); estas enzimas juegan un papel esencial en todos los sistemas del organismo incluyendo el sistema nervioso, inmune, gastrointestinal y cardiovascular (Hare, 2003; Ishide *et al.*, 2003; Barbato y Tzeng, 2004; Ally *et al.*, 2006).



Modificado de Barbato y Tzeng, 2004.

**Figura 3.** Efectos del oxido nítrico sobre el músculo liso vascular.

La NOS-I y la NOS-III son activadas por calcio y calmodulina, mientras la NOS-II es independiente de calcio (Hare, 2003).

Las enzimas NOS son expresadas por una variedad de células, por ejemplo; la NOS $\epsilon$  ha sido identificada en células endoteliales y del músculo liso, miocitos cardiacos, células de hueso y neuronas. La NOS $\eta$  ha sido encontrada en neuronas, músculo esquelético, páncreas e hígado. La enzima NOS $\beta$  puede ser expresada en algún tipo de células bajo la estimulación de citocina, pero es también constitutivamente expresada en algunos tejidos como la pared del intestino (Barbato y Tzeng, 2004; Ally *et al.*, 2006).

La disfunción del endotelio vascular resulta de la reducción de la biodisponibilidad del NO debido a la disminución de su formación o al incremento de su degradación. (Verdejo, 2006).

Muchas patologías vasculares están caracterizadas por el exceso en la generación de especies de oxígeno reactivo, incluyendo el anión superóxido el ion peroxinitrito y la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que inactivan el NO.

Estos defectos en la producción de NO contribuyen a la patogénesis de la hipertensión la trombosis vascular, la aterosclerosis, la aterogénesis, la restenosis y la lesión prostangio plástica (Rossini *et al.*, 2003; Barbato y Tzeng, 2004; Yi-Ching *et al.*, 2005; Hoffman, 2006; Kyoung *et al.*, 2006; Verdejo, 2006).

#### **2.4.2 FACTOR HIPERPOLARIZANTE DERIVADO DEL ENDOTELIO**

El EDHF se encarga de hiperpolarizar el músculo liso vascular mediante la activación de los canales de K<sup>+</sup> sensibles al ATP o Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPasa, provocando su relajación. La entidad química del EDHF no está definida con exactitud, se sugiere que puede ser un

metabolito del ácido araquidónico (Cingolani, 2000, Dvorkin y Cardinali, 2003; Rang *et al.*, 2004).

El ácido araquidónico proviene de la hidrólisis de fosfolípidos de la membrana catalizada por la enzima fosfolipasa A<sub>2</sub>. La actividad de esta enzima se eleva cuando se incrementa la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). Por lo tanto, todo estímulo que aumente la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en la célula endotelial, estimula la liberación del EDHF y del NO (Rang *et al.*, 2004). El EDHF abre canales de calcio en la célula del músculo liso, provocando una hiperpolarización. Esta hiperpolarización cierra los canales de calcio tipo L y disminuye la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la célula, por lo tanto; la disminución en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> provocando la relajación del músculo (Rang *et al.*, 2004).

### **2.4.3 ENDOTELINA**

Las células endoteliales también producen ET-1 que es el vasoconstrictor más potente aislado hasta la fecha. La ET-1, ET-2 y la ET-3 constituyen los miembros de una familia de polipéptidos similares de 21 aminoácidos produciendo acción biológica con efectos cardiacos; estimulando una vasoconstricción intensa de las arterias coronarias. Los estímulos para la producción de ET-1 son la trombina, la angiotensina II, la adrenalina, la vasopresina, el TGFβ y la IL-1. La ET-1 es un regulador paracrino local del tono vascular, estimula el crecimiento y proliferación de diversos tipos de células, incluyendo células endoteliales vasculares, musculares lisas, fibroblastos, células gliales y células mesangiales. La ET-1 puede estimular la proliferación del músculo liso de forma indirecta, facilitando la producción local de otro potente mitógeno, la angiotensina II (Navarro-Cid *et al.*, 1999; Liu, 2005; Ganong, 2006; Guyton, 2006);

### **2.4.4 PROSTACICLINA**

La prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) también llamada prostaciclina, se sintetiza a partir del ácido araquidónico por la ciclo oxigenasa en el músculo liso vascular, por medio de una cadena de reacciones enzimáticas. La síntesis y liberación de PGI<sub>2</sub> se lleva a cabo en respuesta a estímulos fisiológicos que elevan la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico (Kalant y Rouchlau, 2002; Ganong, 2006).

El aumento del Ca<sup>2+</sup> citosólico en la célula endotelial es la señal intracelular que controla la producción y liberación de los vasodilatadores endoteliales (Cingolani y Houssay; 2000).

Además de producir relajación muscular, inhibe la proliferación de las células del músculo liso vascular; la migración de monocitos; inhibe la adherencia y la agregación plaquetaria y por todo esto; puede proteger a los vasos sanguíneos del desarrollo de aterosomas y trombosis (Rang *et al.*, 2004; Ganong, 2006).

#### **2.4.5 MÚSCULO LISO**

Las células del músculo liso de los vasos son ramificadas y establecen un contacto eléctrico y metabólico extenso con células adyacentes por medio de comunicaciones intracelulares. Las células musculares lisas se encuentran en la pared de todos los vasos sanguíneos a excepción de los capilares, su disposición es circular formando varias capas alrededor de la circunferencia del vaso. El músculo liso contiene filamentos de actina y de miosina, de características similares a las del músculo estriado (Christ y Brink, 2000; Kalant y Rouchlau, 2002).

La membrana plasmática tiene invaginaciones superficiales (claveolas), éstas aumentan considerablemente la superficie de las células musculares lisas. El RS del músculo liso es el mayor depósito intracelular de Ca<sup>2+</sup> y desempeña una función de igual magnitud

con respecto a los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  que se relacionan con la contracción y la relajación (Kalant y Rouchlau, 2002).

La contracción de músculo liso es involuntaria y su actividad está regulada por nervios autónomos y por diversos tipos de señales hormonales encargados de integrar las funciones de los órganos. El músculo liso de las paredes de los vasos sanguíneos, de vías respiratorias y de los esfínteres, suele ser tónico y siempre tienen un grado de contracción, ésta fuerza mantenida se denomina tono (Berne y Levy, 2001).

El músculo liso es de gran importancia en muchas enfermedades entre ellas el asma, la hipertensión y la aterosclerosis. (Berne y Levy, 2001).

#### **2.4.6 CONTRACCIÓN DEPENDIENTE DEL ENDOTELIO**

Los factores de contracción más importantes son las endotelinas, la angiotensina II producida localmente, la  $\text{PGH}_2$ , el Tx, y un factor de contracción (EDCF) que se produce en respuesta a la hipoxia (Kalant y Rouchlau, 2002).

El músculo liso se contrae cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aumenta, este aumento puede ser causado por estimulación nerviosa de la fibra lisa, por estimulación hormonal, por distensión de la fibra, o incluso por cambios en el ambiente químico de la fibra, la relación entre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la contracción es menos intensa que en el músculo estriado o cardíaco. Los vasodilatadores o vasoconstrictores actúan aumentando o disminuyendo la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y/o alterando la sensibilidad del sistema contráctil a la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Ganong, 2006; Guyton, 2006).

El proceso contráctil es activado por iones calcio y la energía para la contracción es suministrada por la degradación del trifosfato de adenosina (ATP) o el difosfato de adenosina (ADP). El  $\text{Ca}^{2+}$  se une a la calmodulina y el complejo resultante  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM activa a la cinasa de la miosina de cadena ligera dependiente de calmodulina,

produciendo la fosforilación de la cadena ligera de la miosina y promoviendo la interacción entre miosina II y actina formando un puente transversal, produciendo la contracción. Los puentes cruzados de miosina permanecen unidos a la actina durante cierto tiempo, después del descenso de  $[Ca^{2+}]$  citoplasmático, se produce la contracción sostenida con poco gasto energético (Watterson *et al.*, 2005; Ganong, 2006; Guyton, 2006).

La contracción también puede llevarse a cabo mediante la sensibilización de los miofilamentos al  $Ca^{2+}$  por inhibición de la miosinfosfatasa, lo que facilita la interacción entre la miosina y la actina, y por lo tanto el inicio de la contracción. La relajación normalmente se inicia con una disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$ , que conduce a la desfosforilación de la cadena ligera de la miosina mediante la miosina fosfatasa (Cingolani y Houssay; 2000).

Muchos de los vasodilatadores actúan por medio del AMPc o GMPc, que activan proteínas cinasas (PKA y PKG, respectivamente). La PKA funciona mediante la fosforilación y por lo tanto, inactivando la cinasa de la miosina de cadena ligera y aumentando el flujo de  $Ca^{2+}$ . El GMPc relaja el músculo liso vascular mediante la activación de la PKG y el secuestro del  $Ca^{2+}$  intracelular (Ganong, 2006).

## 2.5 ANTECEDENTES BOTÁNICOS Y ETNOBOTÁNICOS DE LA ESPECIE

### *Prunus serotina*.

#### 2.5.1 DESCRIPCIÓN, NOMBRES COMÚNES Y DISTRIBUCIÓN

##### GEOGRÁFICA DE LA ESPECIE *Prunus serotina*.

Capulín (*Prunus serotina* Ehrh.) es el nombre común con el que se conoce al árbol y al fruto que crece en las serranías mexicanas y en otras regiones del continente americano. El capulín corresponde a una especie polimórfica compuesta por un gran número de variedades y subespecies (Ordaz-Galindo *et al.*, 1999).

*Prunus serotina* Ehrh. sp. *capuli*, es un árbol que mide de 10 a 15 m de altura, de corteza rojiza o café, hojas lanceoladas y aserradas, sus flores son blancas y se agrupan en racimos (**Figura 4**). Su fruto es globuloso de color rojo o negro, de 1.5 cm de diámetro, con semilla y que fructifica entre los meses de mayo y agosto (INI, 1994; Lara y Márquez, 1996).

Los nombres comunes con los cuales se conoce son: Capoli (Méx), Capolín (Méx y Pue), Capulín, Capulín blanco, Ceraso (BCS), Cereso (Mich), Cerezo (Chis), Chencua y chengua (purépecha), Cusabi (tarahumara), Detsé y ghoto (otomí), Jeco y guasiqui (guarigio), Pa ksmuk (mixe), Pate y chimal-ma-u (chontal), Sacatón (Jal), T-mundaya (mixteco), Tunday (zapoteco), Tzu'uri (cora) y Usabi (tarahumara).



**Figura 4.** *Prunus serotina* Ehrh sp. *capuli* (Hojas).

*P. serotina* se encuentra distribuída en toda la República Mexicana, en los estados de Baja California Sur, Coahuila, Colima, Chiapas, Chihuahua, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Lara y Márquez, 1996).

#### **2.5.2 USOS|**

La corteza y el fruto de la especie *P. serotina* han sido utilizados desde tiempos prehispánicos como alimento y remedio medicinal (Ordaz-Galindo *et al.*, 1999).

En Morelos, Hidalgo, Aguascalientes y Estado de México se prepara un jarabe con el fruto que se toma por cucharadas y el cocimiento de las hojas se ingiere cada ocho horas para tratar la tos (INI, 1994). En el Distrito Federal a partir de las hojas se prepara una

infusión, utilizada para el tratamiento de la diarrea y el cocimiento de la raíz, la corteza y las hojas en combinación con miel de abeja es útil para el tratamiento de dolor abdominal. Las ramas se utilizan como agente fortificante para hojearse en el temazcal (INI, 1994).

En Sonora se describe el uso de las hojas y la corteza para tratar la diarrea, el catarro, las nubes en los ojos y las fiebres periódicas. El cocimiento de su corteza puesta al sol, se usa para tratar las “cámaras” de sangre. Finalmente el cocimiento del fruto es utilizado para tratar el “mal de orín” y las hojas se utilizan como agente antiespasmódico (INI, 1994).

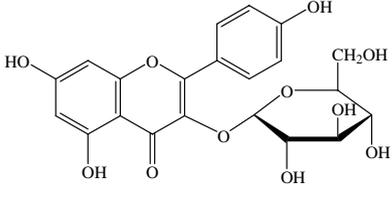
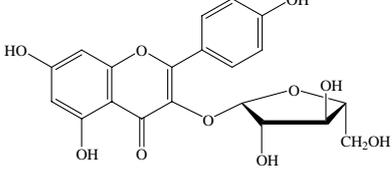
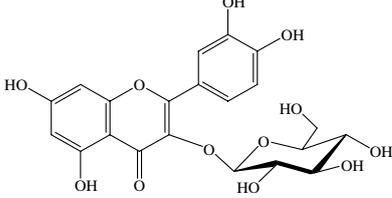
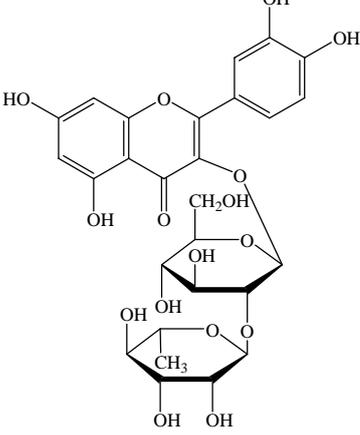
En el siglo XVI, Martín de la Cruz lo señala como útil para el tratamiento de dermatosis y dispepsia y como agente antipruriginoso. Francisco Hernández lo señala como sedante, tónico, “el cocimiento de la corteza cura los disentéricos, el polvo de la misma disuelve las nubes, aclara la vista, alivia las inflamaciones de los ojos y suaviza la lengua reseca por exceso de calor”. A fines del siglo XIX, la sociedad Mexicana de Historia Natural lo indica como antipalúdico (INI, 1994). Para el siglo XX Alfonso Herrera comenta: “es sedativo y narcótico”. Maximino Martínez describe a la especie como agente antidiarreico, antiespasmódico, antipalúdico y para tratar la disentería, la neumonía y las enfermedades del sistema respiratorio (Martínez, 1989). Finalmente la Sociedad Farmacéutica de México lo cita como antidiarreico, antipalúdico, astringente, para tratar gastritis atónica, sedante cardiaco, sedante de la circulación y sedante en catarros bronquiales, laríngeos y tónicos (INI, 1994).

### 2.5.3 ANTECEDENTES QUIMICOS DE *Prunus serotina*.

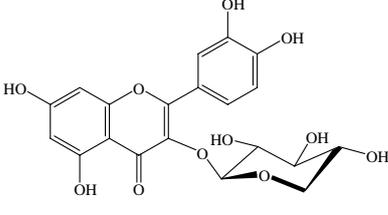
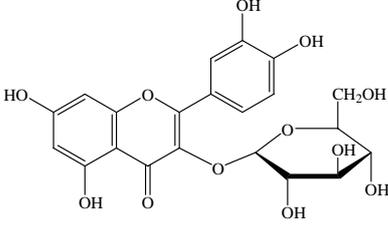
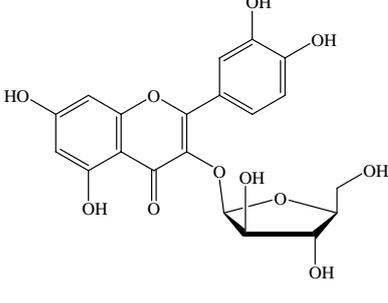
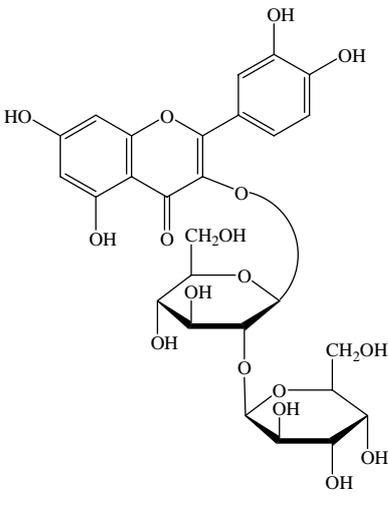
Los estudios químicos realizados sobre la especie *P. serotina* han permitido el aislamiento y la identificación de metabolitos pertenecientes a las categorías de los flavonoides, glicósidos cianogénicos, compuestos fenólicos simples y terpenoides indicados en el **Cuadro 2** (Horsley y Meinwald, 1981; Santamour *et al.*, 1998; Ordaz *et al.*, 1999; Shengmin *et al.*, 2002; Olszewska *et al.*, 2005).

Las hojas contienen aceite esencial, grasa sólida, resina ácida de funciones glucosídicas, amigdalina, un alcaloide de constitución desconocida, ácido tánico, glucosa, principios pépticos, colorantes, clorofila y sales minerales, siendo los elementos más importantes la amigdalina y el alcaloide, se han detectado los triterpenos urs-12-en-28-al-3-beta-ol, los compuestos aromáticos  $\beta$ -D-glucopiranosil benzoato y prunasina (INI, 1994). Mientras que la corteza, contiene almidón, resinas, taninos, ácido gálico, materia grasa leñosa, materia colorante roja, cal, hierro y potasa (Martínez, 1989).

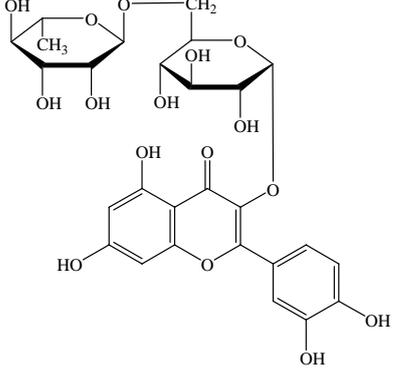
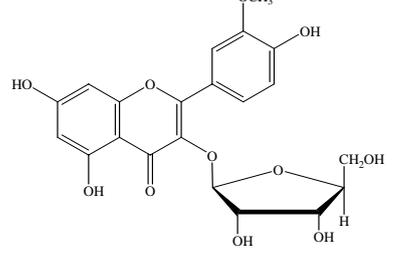
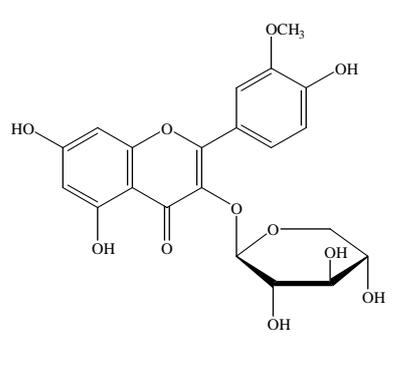
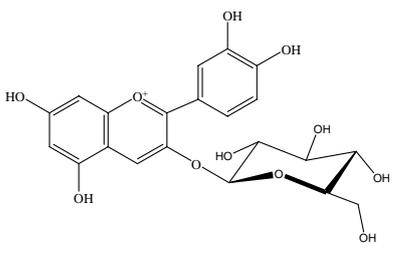
**CUADRO 2** Metabolitos secundarios obtenidos de la especie *Prunus serotina*

Estructura	Nombre	Referencia
<b>Flavonoides</b>		
	<p>3-<i>O</i>-β-D-gluco-piranosido de camferol (astragalina) <b>(1)</b></p>	<p>Olszewska <i>et al.</i>, 2005</p>
	<p>3-<i>O</i>-α-L-arabino-furanósido de camferol (juglanina) <b>(2)</b></p>	<p>Olszewska <i>et al.</i>, 2005</p>
	<p>3-<i>O</i>-β-D-galactósido de quercetina (hiperina) <b>(3)</b></p>	<p>Olszewska <i>et al.</i>, 2005</p>
	<p>3-<i>O</i>-(2''-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil)-β-D-glucopiranosido de quercetina (neohesperósido) <b>(4)</b></p>	<p>Olszewska <i>et al.</i>, 2005</p>

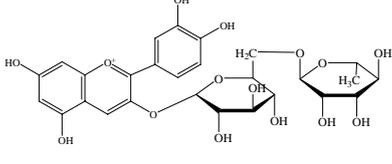
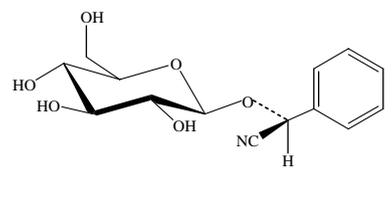
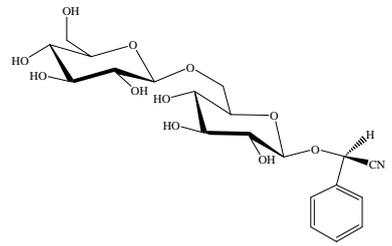
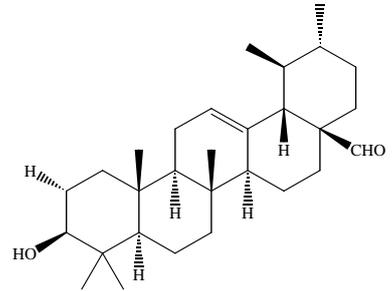
**CUADRO 2.** Metabolitos secundarios obtenidos de la especie *P. serotina* (continuación).

Estructura	Nombre	Referencia
<b>Flavonoides</b>		
	<p>3-<i>O</i>-α-L-arabinopiranosido de quercetina (guaijaverina) <b>(5)</b></p>	<p>Olszewska <i>et al.</i>, 2005</p>
	<p>3-<i>O</i>-β-glucopiranosido de quercetina (isoquercetrina) <b>(6)</b></p>	<p>Olszewska <i>et al.</i>, 2005</p>
	<p>3-<i>O</i>-α-L-arabino furanosido de quercetina (avicularina) <b>(7)</b></p>	<p>Olszewska <i>et al.</i>, 2005</p>
	<p>3-<i>O</i>-(2''-α-L ramnopiranosil)-β-D-galactopiranosido de quercetina <b>(8)</b></p>	<p>Olszewska <i>et al.</i>, 2005</p>

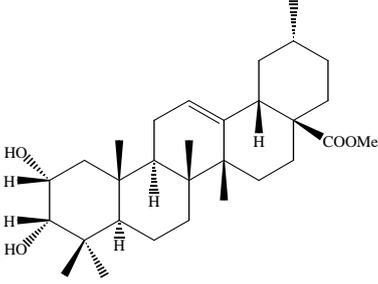
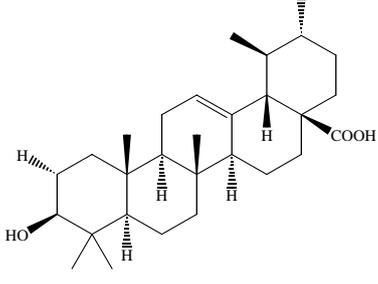
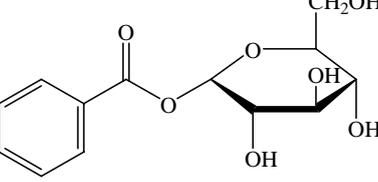
**CUADRO 2.** Metabolitos secundarios obtenidos de la especie *P. serotina* (continuación).

Estructura	Nombre	Referencia
<b>Flavonoides</b>		
	<p>3-<i>O</i>-rutinósido de quercetina (rutina) <b>(9)</b></p>	<p>Olszewska <i>et al.</i>, 2005</p>
	<p>3-<i>O</i>-α-arabinofuranósido de isoramnetina <b>(10)</b></p>	<p>Olszewska <i>et al.</i>, 2005</p>
	<p>3-<i>O</i>-β-D-xilopiranosido de isoramnetina <b>(11)</b></p>	<p>Olszewska <i>et al.</i>, 2005</p>
	<p>3-<i>O</i>-glucósido de cianidina <b>(12)</b></p>	<p>Ordaz <i>et al.</i>, 1999</p>

**CUADRO 2.** Metabolitos secundarios obtenidos de la especie *P. serotina* (continuación).

Estructura	Nombre	Referencia
<b>Flavonoides</b>		
	3- <i>O</i> -rutinósido de cianidina  <b>(13)</b>	<i>Ordaz et al.</i> , 1999
<b>Glucosidos Cianogénicos</b>		
	prunasina <b>(14)</b>	<i>Santamour et al.</i> , 1998
	amygdalina <b>(15)</b>	<i>Santamour et al.</i> , 1998
	aldehído ursólico <b>(16)</b>	<i>Biessels et al.</i> , 1974

**CUADRO 2.** Metabolitos secundarios obtenidos de la especie *P. serotina*  
(continuación).

Estructura	Nombre	Referencia
<b>Triterpenoides</b>		
	<p>2<math>\alpha</math>,3<math>\alpha</math>-dihidroxi-urs-12-en 28-ato de metilo (<b>17</b>)</p>	<p>Biessels <i>et al.</i>, 1974</p>
	<p>ácido ursólico (<b>18</b>)</p>	<p>Biessels <i>et al.</i>, 1974 Hass <i>et al.</i>, 1999 Shengmin <i>et al.</i>, 2002</p>
<b>Compuestos aromáticos simples</b>		
	<p>[<math>\beta</math>-D-glucopiranosil 1- benzoato] (glucosa-1- benzoato) (<b>19</b>)</p>	<p>Horsley y Meinwald, 1981</p>

### 3. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto de investigación es realizar el estudio químico y biológico del extracto hexánico y de la infusión obtenidos de las hojas de la especie *Prunus serotina*.

Los objetivos particulares son:

- Preparar la infusión y el extracto hexánico a partir de hojas secas de capulín mediante el empleo de un método de infusión y maceración respectivamente.
- Realizar el fraccionamiento preliminar de la infusión mediante la aplicación de un proceso de partición y técnicas cromatográficas convencionales.
- Preparar el aceite esencial de las hojas de capulín mediante un proceso de hidrodestilación.
- Realizar el fraccionamiento del extracto hexánico utilizando técnicas cromatográficas convencionales.
- Realizar la separación de los principios activos de interés mediante la aplicación de técnicas cromatográficas convencionales.
- Caracterizar los compuestos aislados mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Realizar la evaluación del efecto relajante de la musculatura lisa de los extractos y los compuestos puros, obtenidos a partir de la especie *Prunus serotina* utilizando el modelo de contracción espontánea en aorta aislada de rata.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL.

### 4.1 Procedimientos generales.

#### 4.1.1 Análisis cromatográficos.

La cromatografía analítica en capa delgada se realizó en placas de aluminio de diferentes dimensiones recubiertas con gel de sílice (60 F<sub>254</sub> Merck, malla 3.5-7.0 ASTM) de 0.25 mm de espesor. Los compuestos se visualizaron con una lámpara de luz UV con una longitud de onda corta (254 nm) y otra larga (365 nm), mediante la aplicación de un agente cromógeno apropiado (**Cuadro 3**). Para favorecer la reacción de los constituyentes con el agente revelador fue necesario calentar las placas en una parrilla hasta la visualización de los compuestos.

La cromatografía en columna abierta se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM) o Sephadex LH-20 (Fluka Chemie GmbH).

**Cuadro 3.** Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa delgada.

Agente revelador	Composición	Referencia
Sulfato cérico amoniacal	12.0 g de sulfato cérico. 22.0 mL de ácido sulfúrico concentrado. 350.0 g de hielo picado	Gaedcke <i>et al.</i> , 2003
Vainillina sulfúrica	3.0 g de vainillina 0.5 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. 100.0 mL de etanol	Gaedcke <i>et al.</i> 2003

#### **4.1.2 Equipos utilizados para la determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.**

Se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM. Los espectros en el IR se obtuvieron con un espectrofotómetro FTIR de rejilla modelo 1605 marca Perkin-Elmer, en pastilla de bromuro de potasio. Los espectros en el UV se determinaron en un espectrofotómetro UV-Vis Lambda 2 utilizando metanol como disolvente. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- $^1\text{H}$ ) y de carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) se generaron en un equipo de 300 MHz en DMSO- $d_6$ , MeOH- $d_4$ ,  $\text{CDCl}_3$  o piridina- $d_5$ , los desplazamientos químicos se reportan en partes por millón (ppm) utilizando como referencia al tetrametilsilano (TMS). Los espectros de masas por impacto electrónico (70 eV) se obtuvieron en un equipo Jeol JMS-SX 102A Hewlett- Packard 5890 serie II acoplado a un cromatógrafo de gases, se utilizó la técnica de introducción directa en la modalidad de bombardeo de átomos rápidos (EM-FAB $^+$ ), usando alcohol nitrobenílico como matriz. Los cromatogramas del aceite esencial se obtuvieron en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM-TOF) LECO Pegasus 4D; se utilizó una columna capilar de 10 m de largo, diámetro interno 180  $\mu\text{m}$  y espesor de película de 0.18  $\mu\text{m}$  marca HP-5MS, como gas acarreador se empleo helio de alta pureza. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se reportan sin corregir. La rotación óptica se registró en un polarímetro Perkin Elmer 241 utilizando como disolvente metanol o cloroformo.

### **4.1.3 Material vegetal.**

El material vegetal, hojas del árbol del capulín utilizado en este proyecto se recolectó en San Juan del Río, Querétaro. Se depositaron muestras de cada una de las especies en el herbario de Querétaro (QMEX). En esta etapa se contó con la participación de los Doctores Luis Hernández, Mahinda Martínez y Marisela Gómez, investigadores de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

## **4.2 Ensayos Biológicos.**

### **4.2.1 Evaluación de la actividad relajante en músculo liso de aorta aislada de rata.**

Para la evaluación de la actividad relajante en músculo liso de aorta se emplearon ratas de la cepa Wistar (ambos sexos, 250-300 g), las cuales fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital y sacrificadas por decapitación. Se removió la aorta torácica y se colocó en una solución fría de Krebs-Heinseleit (pH 7.4; 126.8 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5mM D-glucosa). Se eliminó el tejido adiposo y conectivo de la aorta y se cortaron anillos de 4-5 mm (Feelisch *et al.*, 1999; Fostermann *et al.*, 1994). En algunos casos el endotelio se removió mecánicamente (Galle *et al.*, 1999; Ibarra-Alvarado *et al.*, 2002). Los anillos de aorta se montaron en cámaras de incubación de 7 mL con solución de Krebs-Heinseleit a 37 °C, la cual se burbujeó constantemente con una mezcla de gas carbógeno (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>).

Las contracciones mecánicas se registraron isométricamente por medio de transductores de fuerza Grass modelo FTO3 acoplados a un polígrafo Grass de 6 canales modelo 7-8P.

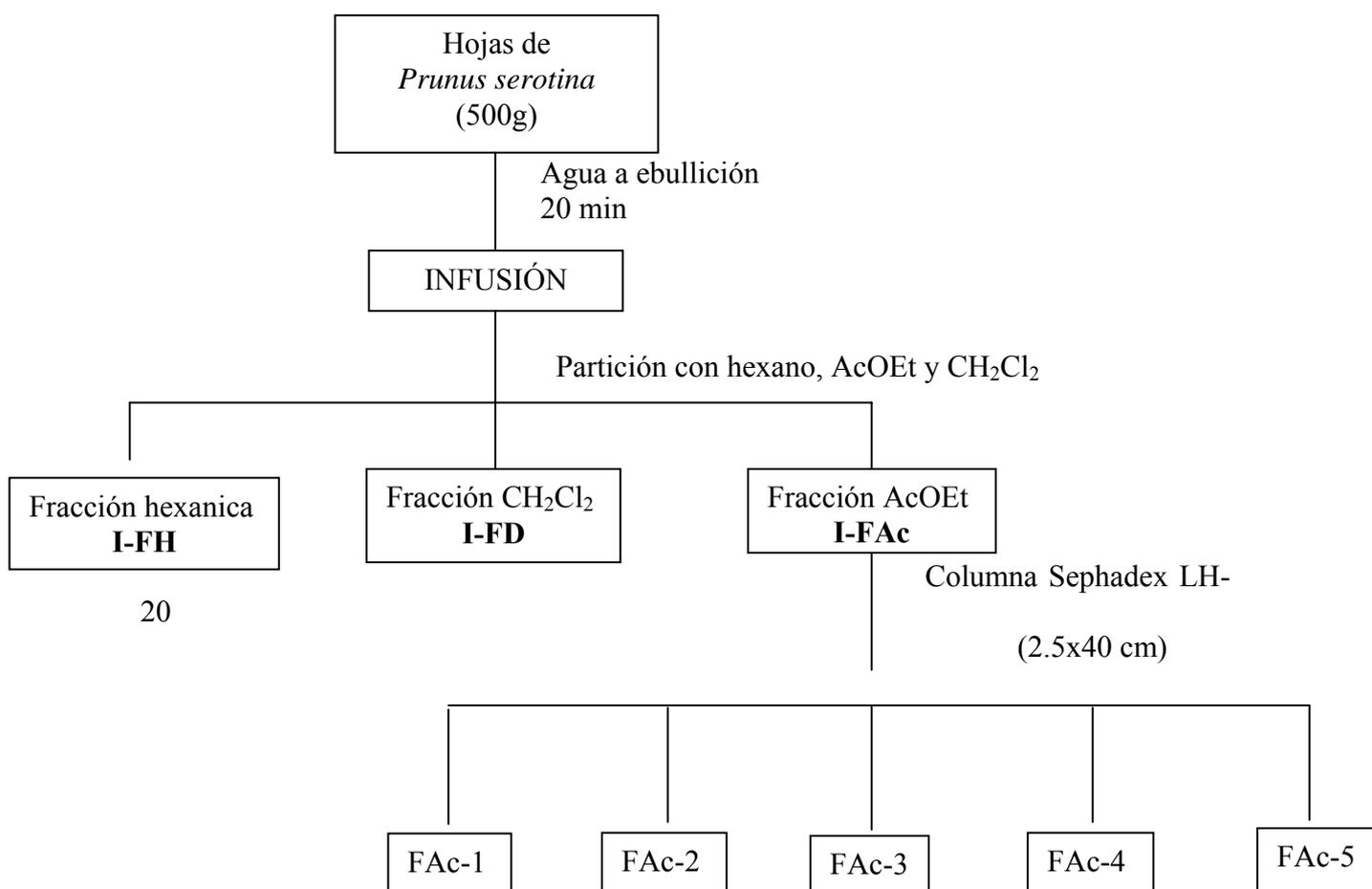
El tejido se sometió a una tensión de reposo (basal) de 1.5 g y se dejó estabilizar por alrededor de 90 min. Una vez que el tejido alcanzó el equilibrio, los segmentos se pre-contrajeron con KCl (100 mM) durante 15 minutos para estimular el músculo arterial. A continuación, se eliminó el KCl lavando 8 veces cada una de las cámaras. La aorta se dejó reposar hasta alcanzar nuevamente su tensión basal de 1.5 g. Una vez estabilizado el tejido, los segmentos de aorta se contrajeron con una solución de fenilefrina (1  $\mu$ M).

Los compuestos **(18)**, **(20)** y **(21)** obtenidos de la especie *Prunus serotina* se evaluaron en un rango de concentraciones de 1  $\mu$ g/mL a 1000  $\mu$ g/mL. Las diferentes concentraciones de los compuestos puros se disolvieron en agua tridestilada y se adicionaron en las cámaras de tejido aislado 20 minutos después de haber inducido la contracción de la aorta con la solución de fenilefrina. La respuesta inducida por cada una de las concentraciones de los compuestos puros en la aorta se registró durante un período de 10 min. Los cambios en la tensión producidos por los compuestos **(18)**, **(20)** y **(21)** se detectaron mediante transductores de fuerza (FTO3 Grass), acoplados a un polígrafo Grass. La información obtenida fue procesada por el programa PolyView (Grass). Las respuestas se expresaron como el porcentaje de la contracción alcanzada al adicionar la solución de fenilefrina (Feelisch *et al.*, 1999).

### 4.3 Estudio fitoquímico de *Prunus serotina*.

#### 4.3.1 Preparación y fraccionamiento de la infusión obtenida de las hojas de *Prunus serotina*.

Para la preparación de la infusión se utilizaron 500 g de hojas de capulín molido, las cuales fueron extraídas con un 1 L de agua a ebullición por un periodo de veinte minutos. El extracto se sometió a un fraccionamiento primario mediante un proceso de partición utilizando como disolventes hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOEt. Este procedimiento se resume en el **Esquema 1**.



**Esquema 1.** Fraccionamiento preliminar de la infusión de las hojas de *Prunus serotina*.

Las fracciones **FH**, **FD** y **FAc** obtenidas en este fraccionamiento se concentraron al vacío obteniendo residuos con las características que se describen en el **Cuadro 4**.

**Cuadro 4** Descripción de las fracciones obtenidas del fraccionamiento primario de la infusión de las hojas de *Prunus serotina*.

Disolvente	Extracciones	Descripción	Rendimiento %
hexano	3	Residuo mínimo color verde oscuro	0.0314
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3	Residuo color café amarillento	0.2106
AcOEt	5	Residuo color ámbar con precipitado color amarillo	1.1066

#### 4.3.2 Fraccionamiento secundario de la fracción FAc obtenida.

La fracción FAc se sometió a un fraccionamiento secundario utilizando una columna de Sephadex LH-20 (2.5x40 cm) y como fase móvil MeOH. Se colectaron fracciones de 100 mL cada una. Este procedimiento permitió la obtención de 30 fracciones las cuales se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica, generando un conjunto de 5 fracciones. En el **Cuadro 5** se resume este procedimiento cromatográfico.

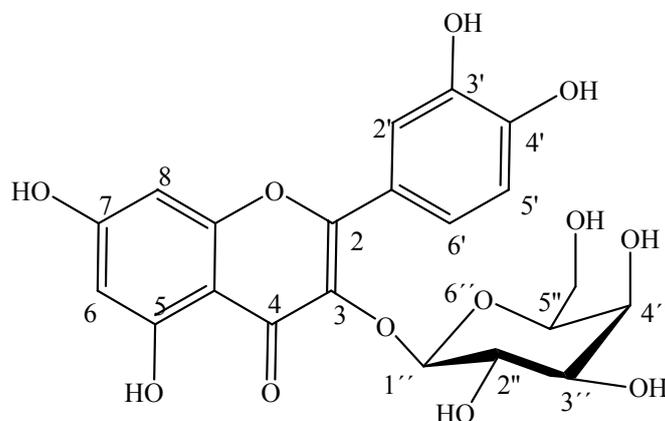
**Cuadro 5** Fraccionamiento secundario de la fracción FAc.

Eluyente	Proporción %	Fracciones recolectadas	Clave
MeOH	100	1-5 6-10 11-16 17-21 22-30	FAc-1 FAc-2 FAc-3 FAc-4 FAc-5

#### 4.3.3 Aislamiento de la hiperina (20) a partir de la fracción secundaria FAc-3.

De la fracción secundaria **FAc-3** (9.68 g) cristalizó espontáneamente un sólido amarillo con punto de fusión 235-236 °C, (42.5 mg) este sólido se identificó como la hiperina **CAc-3**.

**Hiperina [3-O-β-galactósido de quercetina]**: pf. 235-236 °C; IR, KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3430 (OH quelatado), 2900 (C-H, alifático), 1655 (C=O quelatado), 1607 (CH=CH aromático), 1086 (C-O); RMN<sup>1</sup>H, (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta_{\text{H}}$  5.40 (1H, d,  $J = 7.0$ , H-1''), 6.20 (1H, d,  $J = 1.9$ , H-6), 6.41 (1H, d,  $J = 1.9$ , H-8), 6.81 (1H, d,  $J = 8.4$ , H-5'), (1H, dd,  $J = 8.4, 2.1$ , H-6'), 7.52 (1H, d,  $J = 2.1$ , H-2'); RMN<sup>13</sup>C (75 MHz DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta_{\text{C}}$  177.5 (C-4), 164.1 (C-7), 161.2 (C-5), 156.3 (C-2, C-9), 148.4 (C-4'), 144.8 (C-3'), 133.5 (C-3), 122.0 (C-1'), 121.1 (C-6'), 116.0 (C-5'), 115.2 (C-2'), 103.9 (C-10), 101.8 (C-1''), 98.6 (C-6), 93.5 (C-8), 73.2 (C-3''), 71.2 (C-2''), 68.0 (C-4''), 75.8 (C-5''), 60.4 (C-6''); FAB<sup>+</sup>  $m/z$  (int. rel.): 465 [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>) (6), 303 (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>) (18), 289 (13.5), 176 (10.5), 154 (100), 136 (67), 107 (18.0) (Liu *et al.*, 2007).



**Figura 5.** Estructura de la hiperina (**20**).

#### 4.3.4 Aislamiento de la prunina a partir de la fracción **FAc-4**.

La fracción **FAc-4** se sometió a un fraccionamiento terciario por cromatografía sobre sílica gel C<sub>18</sub> (100 g) y utilizando como fase móvil MeOH-agua 70:30. Este proceso generó un total de 50 fracciones (50 mL cada una), reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica para obtener así tres conjuntos de fracciones (**Cuadro 6**).

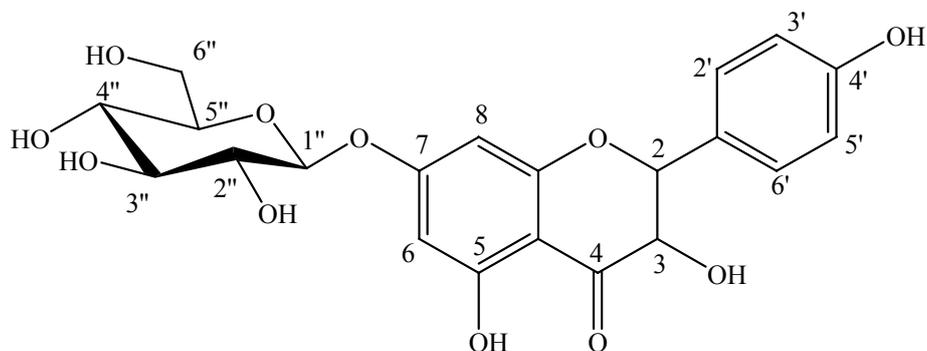
**Cuadro 6** Resumen del fraccionamiento terciario por cromatografía en columna de gel de sílice C<sub>18</sub> de la fracción **FAc-4** secundaria.

Eluyente	Proporción %	Fracciones recolectadas	Clave
MeOH-agua	70:30	1-19	FAc-4I
		20-34	FAc-4II
		35-50	FAc-4III

De la fracción terciaria **FAc-4II** cristalizaron de manera espontánea 87.6 mg de un sólido blanco con punto de fusión de 228°C, el cual se identificó como la prunina (**21**) **CAc-4II**.

**Prunina [7-O-β-glucósido de naringenina]:** pf. 228 °C; IR, KBr, v cm<sup>-1</sup>: 3400 (OH), 2927 (C-H), 1641 (C=O quelatado), 1619 (aromaticidad), 1274, 1176; FAB<sup>+</sup> m/z (int rel.): 435 [M+H]<sup>+</sup> (13.8), 307 (26.8), 289 (16.2), 273 (C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>) (22), 154 (100), 137 (59), 136 (64), 107 (19,0); RMN<sup>1</sup>H, (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ<sub>H</sub> 2.78 (1H, dd, J=3.1, 17.4 Hz, H-3 eq), 3.21 (1H, dd, J=12.9,17.4 Hz, H-3ax), 3.30 (6H, m), 4.93 (1H, dd, J=7.2 Hz, H-1'), 5.42 (1H, dd, J=3.1, 12.8Hz, H-2ax), 6.14 (2H, s H-6, H-8), 6.81(2H, d, J=8.6 Hz, H-3', H-5'), 7.29 (2H, d, J=8.6 Hz, H-2, H-6'); RMN<sup>13</sup>C (75 MHz DMSO-d<sub>6</sub>): δ<sub>C</sub> 78.7(C-2), 42.4 (C-3), 196.5 (C-4), 163.2 (C-5), 46.70(C-6), 165.3 (C-7), 95.5 (C-8), 162.7 (C-4), 103.4 (C-10), 128.5 (C-1'), 128.0 (C-2'), 115.3 (C-3'), 157.8 (C-4'),

115.3 (C-5'), 128.0 (C-6'), 99.8 (C-1''), 73.0(C-2''), 76.4 (C-3''), 64.6 (C-4''), 77.1 (C-5''), 60.8 (C-6'') (Lu y Foo, 1997; Liu *et al.*, 2007).



**Figura 6.** Estructura de la prunina (21).

#### 4.3.5 Preparación del aceite esencial de las hojas de *P. serotina*.

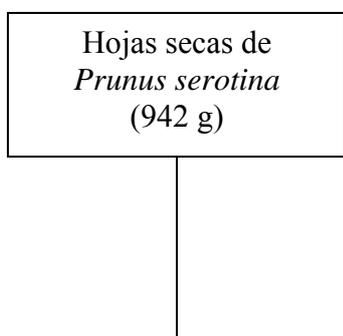
Para la preparación de la esencia analizada en el presente estudio se utilizaron 100 g de material vegetal (hoja seca). Se utilizó la técnica de hidrodestilación y la esencia se separó del destilado mediante un proceso de partición con AcOEt, la extracción se repitió tres veces. Las fases orgánicas resultantes se concentraron a presión reducida. Los constituyentes presentes en la esencia se identificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

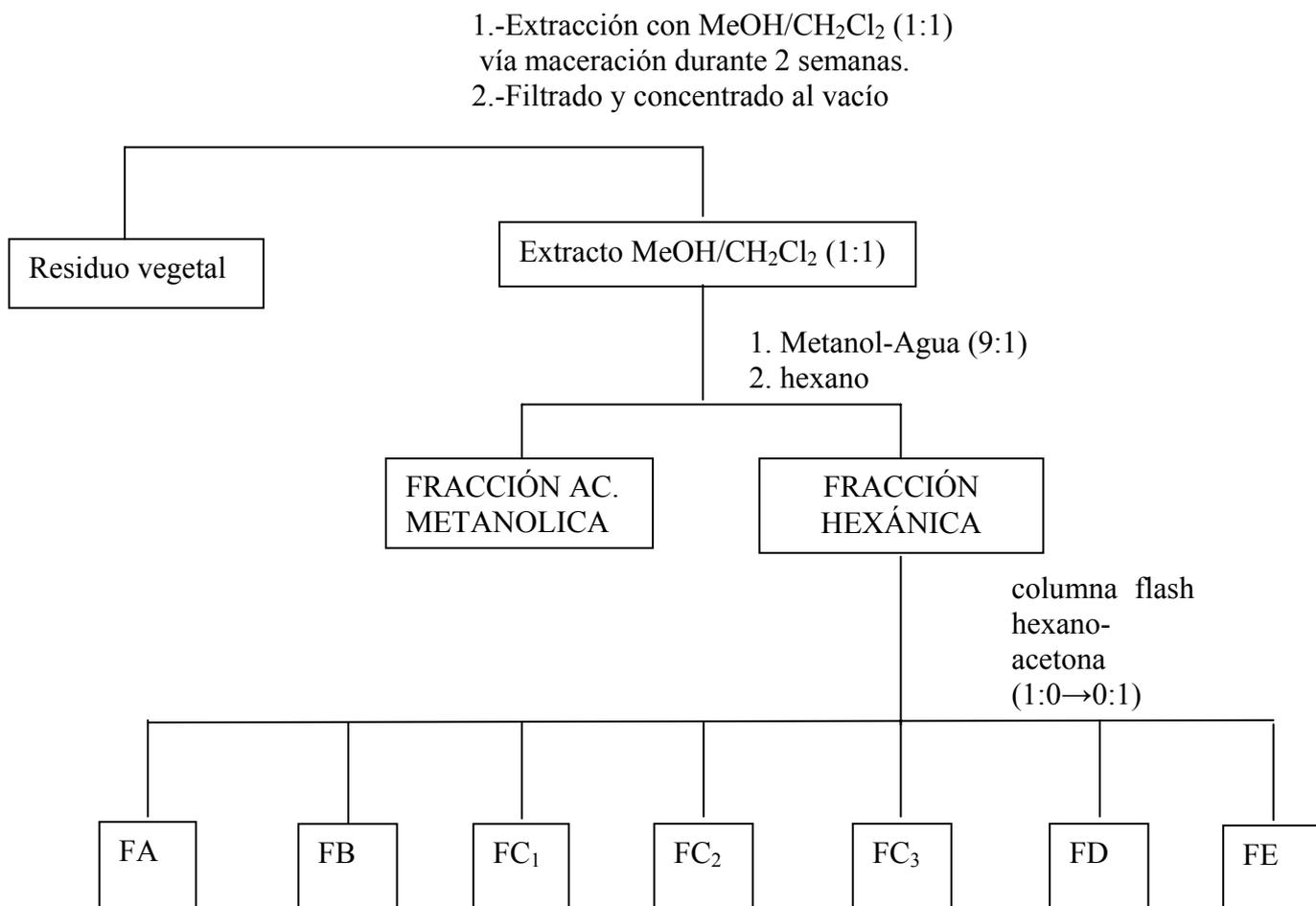
#### 4.3.6 Obtención del extracto total a partir de las hojas de capulín.

940 g de hojas de capulín molido (desechado), se extrajeron durante 2 semanas con una mezcla de MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), mediante una técnica de maceración. El fluido resultante se filtró y se concentró al vacío, obteniéndose 28.09 g de un extracto de consistencia cerosa de color verde oscuro.

##### 4.3.6.1 Fraccionamiento primario del extracto total de las hojas secas de *Prunus serotina*.

El extracto total obtenido en el inciso 4.3.6 se sometió a un fraccionamiento primario mediante un proceso de partición utilizando hexano y MeOH acuoso. En el **Esquema 2** se resume el proceso de extracción y fraccionamiento del extracto de *P. serotina*. La fracción hexánica fue tratada con carbón activado (dos veces) para eliminar la mayor cantidad de material colorante obteniéndose 13.9 g de un residuo color del verde oscuro.





**Esquema 2.** Extracción y fraccionamiento preliminar del extracto total de las hojas de *P. serotina*.

#### 4.3.6.2 Fraccionamiento secundario de la fracción hexánica.

La fracción hexánica fue sometida a un fraccionamiento cromatográfico en una columna al vacío de gel de sílice (tamaño de partícula 0.063 mm 50% y 0.2-0.3 mm 50%) (250 g), utilizando como eluyentes hexano-acetona (diversas proporciones). Este procedimiento generó 10 fracciones de 500 mL cada una, las cuales se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica, generando un conjunto de 7 fracciones. En el **Cuadro 7** se resume este fraccionamiento secundario.

**Cuadro 7** Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna al vacío de gel de sílice.

<b>Eluyente</b>	<b>Proporción %</b>	<b>Fracciones Recolectadas</b>	<b>Clave</b>
hexano	100	1	F-A
hexano-acetona	95:5 90:10	2	F-B
		3	F-C1
		4	F-C2
		5	F-C3
		6	
hexano-acetona	80:20	7-10	F-D
acetona	100	11	F-E

La fracción secundaria **F-D** (16.6 g) fue recromatografiada en una columna con gel de sílice (200 g) tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, empleando como eluyentes una mezcla de hexano-acetona (diferentes proporciones) con este procedimiento se obtuvieron 16 fracciones de 50 mL cada una, las cuales se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica, generando un conjunto de 5 fracciones. En el **Cuadro 8** se resume el fraccionamiento terciario de la fracción **F-D**.

**Cuadro 8** Fraccionamiento terciario de la fracción **F-D** por cromatografía en columna.

<b>Eluyente</b>	<b>Proporción %</b>	<b>Fracciones recolectadas</b>	<b>Clave</b>
hexano	100	1	F-D1
hexano-acetona	95:5	2-7	F-D2
hexano-acetona	90:10	8	F-D3
hexano-acetona	70:30	9-14	F-D4
hexano-acetona	50:50	15-16	F-D5

#### 4.3.6.3 Aislamiento del ácido ursólico a partir de la fracción **F-D5**.

La fracción terciaria **F-D5** (1.3 g) se fraccionó, en una columna fase reversa  $C_{18}$  de gel de sílice 60 (100 g) empleando como eluyente MeOH con este procedimiento se

obtuvieron 4 fracciones de 50 mL cada una, las cuales se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica, generando 2 fracciones cuaternarias **FD5-I** y **FD5-II**.

La fracción **FD5-I** se sometió a un fraccionamiento en columna de gel de sílice C<sub>18</sub> (100 g) empleando como eluyente MeOH, con este procedimiento se obtuvieron 21 fracciones de 50 mL cada una, las cuales se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica, generando 6 fracciones. En el **Cuadro 9** se resume este fraccionamiento.

**Cuadro 9.** Fraccionamiento de la muestra **FD5-I**, utilizando una columna de gel de sílice C<sub>18</sub>.

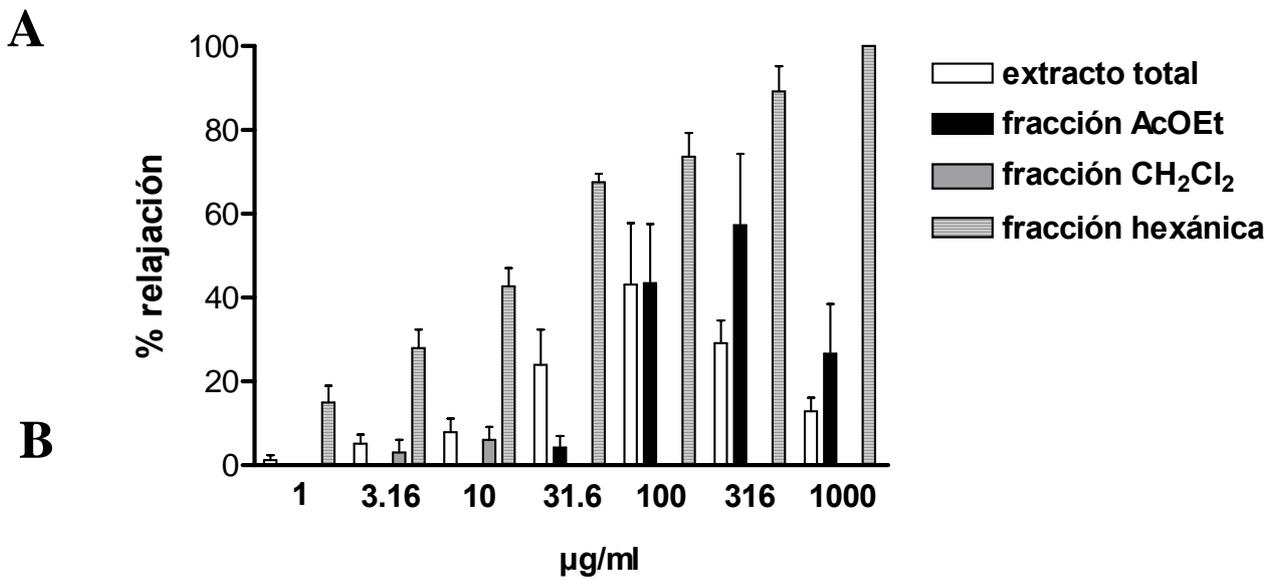
<b>Eluyente</b>	<b>Proporción %</b>	<b>Fracciones recolectadas</b>	<b>Clave</b>
MeOH	100	1	FD5-I1
		2-4	FD5-I2
		5-7	FD5-I3
		8-12	FD5-I4
		13-16	FD5-I5
		17-21	FD5-I6

De la fracción **FD5-I2** precipitaron de manera espontánea 77.9 mg de un sólido color blanco con un punto de fusión de 239-242°C (**FI-2**). Este compuesto se identificó como el ácido ursólico (**18**) por comparación con una muestra auténtica y de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con aquellas reportadas en la literatura (Mahato y Kundu, 1994; Dufour *et al.*, 2007).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

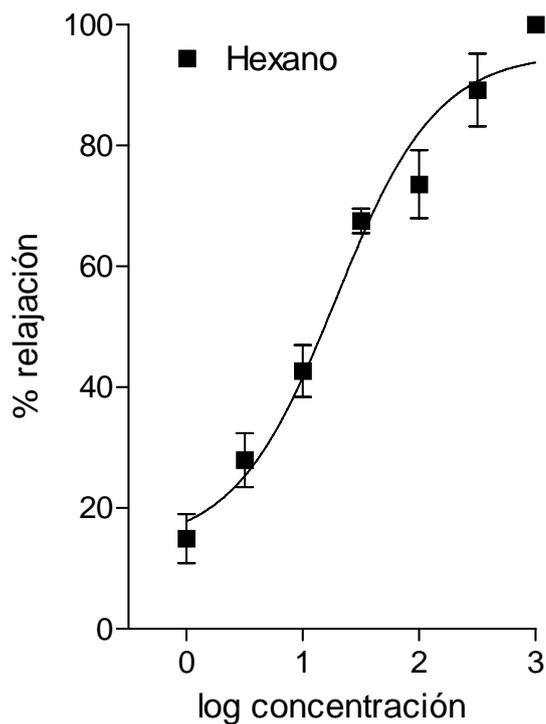
La especie *Prunus serotina* Ehrh. se seleccionó con base en un criterio etnomédico, el cual constituye uno de los criterios más importantes para seleccionar las materias primas destinadas al descubrimiento de compuestos biológicamente activos (Mata, 2000; López, 1999). Esta especie es ampliamente utilizada en la práctica médica popular y se tiene reportes de su uso desde épocas prehispánicas como antitusivo, como antidiarreico, antiespasmódico y para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares e hipertensión.

El estudio fitoquímico biodirigido del extracto hexánico obtenido a partir de las hojas de la especie utilizando como ensayo de monitoreo la actividad relajante en músculo liso de aorta aislada de rata con la finalidad de aislar los compuestos biológicamente activos. Estudios preliminares permitieron observar que el extracto total produjo una respuesta bifásica en la musculatura lisa arterial, la cual consistió en una relajación inicial que llegó a su punto máximo a la concentración de 100 µg/mL, seguida de una disminución del efecto relajante en concentraciones mayores a 100 µg/mL (**Figura 7**). Por otro lado, la fracción hexánica mostró un efecto vasorelajante máximo sobre la aorta aislada de rata ( $CE_{50} = 19.2 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$ ;  $E_{\text{max}} = 100 \%$ ) (**Figura 8**).



**Figura 7** Efecto sobre la musculatura lisa arterial del extracto total y fracciones de *Prunus serotina*.

A) Registro representativo del efecto bifásico producido por el extracto total de *P. serotina* sobre la aorta de rata. B) Efecto vasoactivo sobre aorta aislada de rata de las fracciones obtenidas de *P. serotina*.

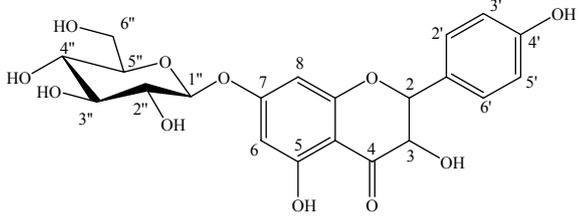
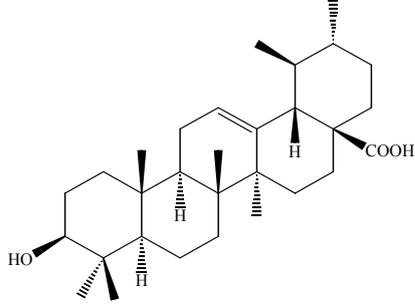
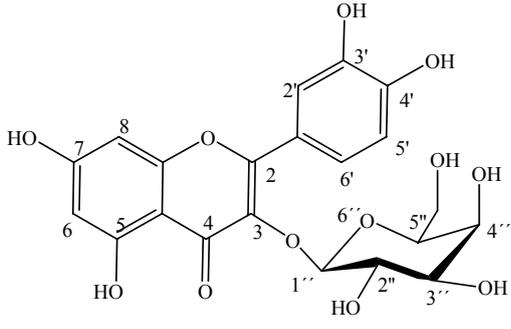


**Figura 8.** Curva concentración respuesta del efecto relajante de las fracción hexánica de *P. serotina*

El estudio químico biodirigido de la fracción hexánica de las hojas de *P. serotina* permitió el aislamiento y la caracterización de un triterpenoide [ácido ursólico] (**18**) y de dos flavonoides [hiperina (**20**) y prunina (**21**)].

Los compuestos aislados en el presente estudio son ampliamente conocidos por sus propiedades y todos ellos han sido descritos previamente en el género *Prunus*. Todos los compuestos fueron caracterizados por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con aquellas reportadas en la literatura y por comparación con muestras auténticas. En el **Cuadro 10** se muestran las estructuras de los compuestos aislados.

**Cuadro 10.** Compuestos aislados de *Prunus serotina*

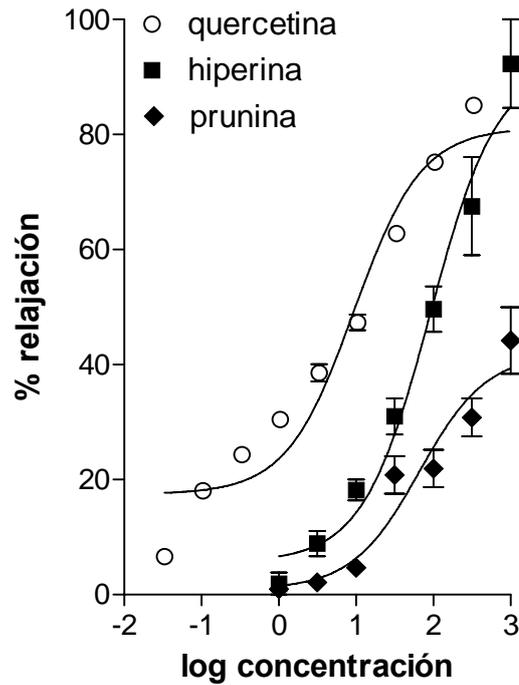
COMPUESTO	RENDIMIENTO (%)
 <p>7-O-<math>\beta</math>-D-glucósido de naringenina [prunina, <b>(21)</b>]</p>	0.01752
 <p>ácido ursólico (<b>18</b>)</p>	0.00827
 <p>3-O-<math>\beta</math>-galactósido de quercetina [hiperina, <b>(20)</b>]</p>	0.00850

La capacidad que tienen los flavonoides para modular el tono vascular reduce el riesgo de la mortalidad causada por enfermedades cardiacas (Orallo *et al.*, 1998; Trigueiro *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004; Woodman, 2004; Woodman *et al.*, 2005; Morello *et al.*, 2006; Perez-Vizcaino *et al.*, 2006).

El flavonoide hiperina (**20**) evaluado en este estudio, indujo una relajación, dependiente de la concentración, en segmentos intactos de aorta aislada de rata (**Figura 9**) presentando un efecto máximo de  $92.31 \pm 7.69 \%$  ( $CE_{50} = 91.25 \pm 1.34 \mu\text{g/ml}$ ), este efecto resultó ser menos potente que el de la quercetina ( $CE_{50} = 9.42 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$ ;  $E_{\text{max}} = 79.00 \pm 4.7 \%$ ) empleada como control positivo. En tanto que la prunina (**21**) presentó una menor eficacia y potencia ( $CE_{50} = 66 \pm 1.5 \mu\text{g/ml}$ ) comparada con la actividad de la hiperina (**Cuadro 11**).

**Cuadro 11.** Efecto relajante de los compuestos aislados sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta intactos.

Compuestos	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$E_{\text{max}}$ (%)
hiperina ( <b>20</b> )	$91.25 \pm 1.3$	$92.3 \pm 7.7$
prunina ( <b>21</b> )	$66 \pm 1.5$	$44.2 \pm 5.6$
ácido ursólico ( <b>18</b> )	$480 \pm 1.5$	$72.4 \pm 2.5$
quercetina	$9.42 \pm 1.2$	$79.0 \pm 4.7$

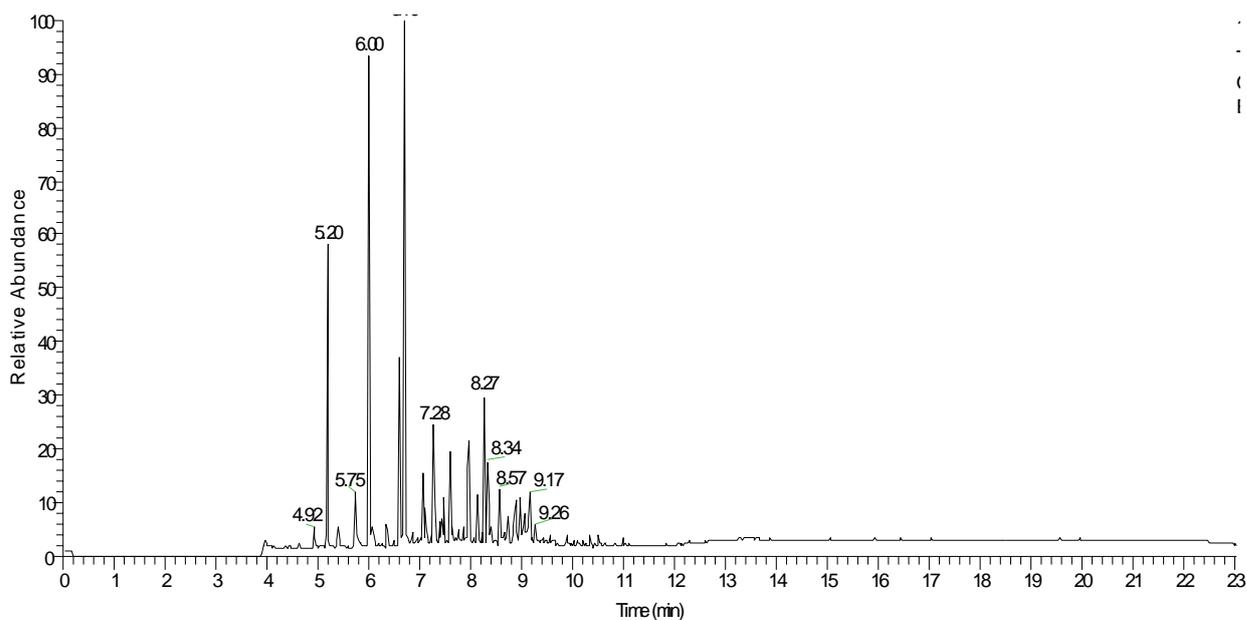


**Figura 9.** Comparación de las curvas concentración respuesta del efecto relajante de la quercetina, hiperina (20) y prunina (21) en segmentos de aorta intactos de rata.

Por otra parte la presencia del ácido ursólico, triterpeno pentacíclico ampliamente distribuido en el reino vegetal que se encuentra en forma de ácido libre o aglicona de saponinas triterpenoides posee varias propiedades farmacológicas incluyendo: antibacterianas, antiinflamatorias, analgésicas, antidiabéticas (hipoglucemiante), antiulcerosas, hepatoprotectoras, antihipertensivas, antioxidantes y antiescleróticas, entre otras (Aguirre-Crespo *et al.*, 2006; Saravanan *et al.*, 2006; Rajendrasozhan *et al.*, 2006; Janicsák *et al.*, 2006; Dufour *et al.*, 2007).

Finalmente, la identificación de los componentes presentes en el aceite esencial, se realizó mediante un análisis de Cromatografía de Gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM). El cromatograma de gases indicó la presencia de siete componentes mayoritarios en la esencia (**Figura 10**). Estos productos fueron identificados mediante

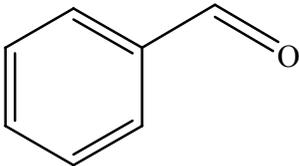
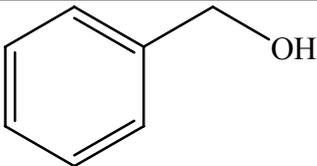
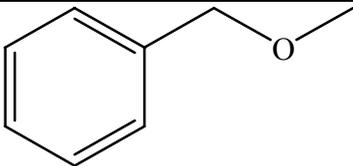
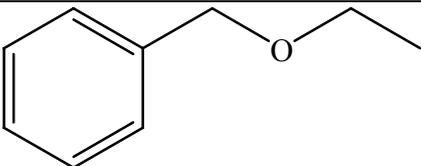
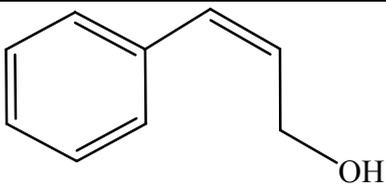
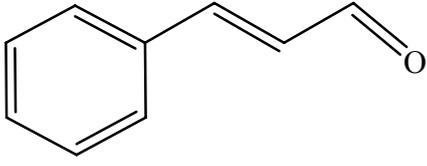
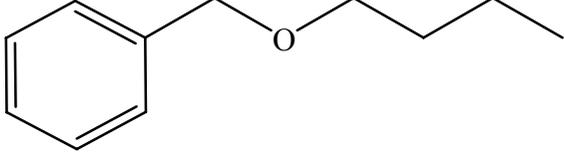
la comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca del equipo y los que se encuentran en el sitio de internet de la National Institute of Standards and Technology (NIST) [<http://webbook.nist.gov/chemistry/>]. Los cuáles representan el 83 % de los constituyentes presentes en la esencia.



**Figura 10** Cromatograma de gases obtenido del aceite esencial de las hojas de *P.serotina*.

En el **Cuadro 12** se resumen los tiempos de retención y la proporción en la esencia de cada uno de los componentes.

**Cuadro 12** Constituyentes del aceite esencial de las hojas de *Prunus serotina*.

	Nombre	Abundancia relativa	t <sub>R</sub> (mi)	Formula
	benzaldehído	60	5.20	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O
	alcohol bencílico	94	6.00	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O
	α-metoxytolueno	100	6.70	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O
	bencil-etil éter	26	7.28	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O
	alcohol cinánico	22	7.60	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O
	cinamaldehído	20	7.97	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O
	bencil-butil éter	12	8.13	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O

## **6. RESUMEN Y CONCLUSIONES.**

El estudio químico biodirigido de las hojas secas de la especie *Prunus serotina*, permitió establecer los principios vasorelajantes de esta especie medicinal. De acuerdo con la potencia demostrada por los principios aislados se concluye que la hiperina y la prunina constituyen los principios activos vasorelajantes mayoritarios de la infusión de las hojas de *P. serotina*. Por otra parte, en el caso del extracto hexánico se aisló y caracterizó el triterpenoide ácido ursólico el cual presenta una actividad vasorelajante muy modesta.

La presencia de la hiperina, prunina y del ácido ursólico puede estar relacionada con los usos descritos en la medicina tradicional para la especie *P. serotina*. Las hojas de la especie son altamente apreciadas para el tratamiento de la diarrea, disentería, espasmos, paludismo, contra neumonía y para enfermedades del sistema respiratorio.

## 7. PERSPECTIVAS

El presente trabajo de investigación sobre las hojas de la especie *Prunus serotina* Ehrh, se realizó con la finalidad de contribuir al conocimiento químico y biológico de esta especie medicinal. Sin embargo, es necesario generar mayor información acerca de esta planta. Es por ello que a partir de este trabajo se han formulado las siguientes perspectivas:

- 1.- Continuar con el aislamiento y caracterización química de los compuestos minoritarios de la fracción hexánica.
2. Aislar y caracterizar los componentes detectados en el aceite esencial del capulín.
- 3.- Desarrollar y validar un método de cuantificación para determinar la presencia de hiperina y prunina en productos derivados del capulín.
- 4.- Realizar experimentos adicionales con la finalidad de establecer el mecanismo mediante el cual los compuestos aislados ejercen su efecto de vaso relajación sobre el modelo de la aorta de rata.
- 5.- Explorar el efecto vaso relajante del aceite esencial de las hojas del capulín.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, A. (2001). Plantas medicinales del centro de México. Guías de México desconocido. México, 145-147.
- Aguilar, A., Camacho, J. R. (1994). Plantas medicinales del herbario. 1ª Edición, México. Instituto Mexicano del Seguro Social, 60-61.
- Aguirre-Crespo, F., Vergara-Galicia, J., Villalobos-Molina, R., López-Guerrero, J. J., Navarrete-Vázquez, G. y Estrada-Soto, S. (2006). Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity of *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. *Life Science*, **79**, 1062-1068.
- Ajay, M., Hassan, G. A., Mustafa, M. R. (2003). Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences*, **74**, 603-612.
- Alanis, A. D., Calzada, F., Cedillo-Rivera, R. y Meckes, M. (2003). Antiprotozoal activity of the constituents of *Rubus coriifolius*. *Phytotherapy Research*, **17**(6), 681-682.
- Ally, A., Phattanarudeec, S., Kabadic, S., Patel, M., Maherc, T. (2006). Cardiovascular responses and neurotransmitter changes during static muscle contraction following blockade of inducible nitric oxide synthase (iNOS) within the ventrolateral medulla. *Journal Brain Research*, **1090**, 123-133.
- Argueta, V. A. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo I, México, Instituto Nacional Indigenista, 319-320.
- Arqueología Mexicana, (2007). Edición Especial Códices. Códice Nuttall. 23.
- Arrieta, J., Reyes, B., Calzada, F., Cedillo-Rivera, R. y Navarrete, A. (2001). Amoebicidal and giardicidal compounds from the leaves of *Zanthoxylum liebmannianum*. *Fitoterapia*, **72**(3), 295-297.
- Barbato, J. E. y Tzeng (2004). Nitric oxide and arterial disease. *Journal of Vascular Surgery*, **40**(1), 187-193.

- Bejar, E., Amarquaye, A., Che, Ch., Malone, M. H. y Fong, H. H. (1995). Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. *International Journal of Pharmacognosy*, **33**(1), 25-32.
- [Berenguer, N. V.](#), [Giner, G. R. M.](#), [Grane, T. N.](#) y [Arrazola P. G.](#) (2002). Chromatographic determination of cyanoglycosides prunasin and amygdalin in plant extracts using a porous graphitic carbon column. [Journal Agriculture Food Chemistry](#), **50**(24), 6960-3.
- Biessels, H. W. A., Van Der Kerk-Van Hoof, A. C., Kettens-Van Den Bosch, J. J. y Salemink, C. A. (1974). Triterpenes of *Prunus serotina* and *Prunus lusitanica*. *Phytochemistry*, **13**, 203-207.
- Bonaventura, D., Oliveira, F. S., Lunardi, C. N., Vercesi, J. A., da Silva, R. S. y Bendhack, L. M. (2006). Characterization of the mechanisms of action and nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex. *Nitric Oxide*, **15**, 387-394.
- Bye, R. (1995). Phytochemistry of medicinal plants. Recent advances in *Phytochemistry*, **29**, 65-82.
- Calzada, F., Cerda-Garcia-Rojas, C. M., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R., Bye, R. y Mata, R. (1999). Geranins A and B, New Antiprotozoal A-Type Proanthocyanidins from *Geranium niveum*. *Journal of Natural Products*, **62**(5), 705-709.
- Casanueva, E., Kaufer, H. M., Pérez, L. A. (2004). Nutriología Médica. México, 2ª Edición, Editorial Médica Panamericana, 312-313.
- Christ, J. G. y Brink, P. R. (2000). Gap junctions in isolated rat aorta: evidence for contractile responses that exhibit a differential dependence on intercellular communication. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **33**, 423-429.
- Cingolani, H. E. y Houssay, A. B. (2000). Fisiología humana de Houssay. 7ª Edición, Buenos Aires, El Ateneo, 247-243.

- da Silva, K. L., dos Santos, A. R., Mattos, P. E., Yunes, R. A., Delle-Monache, F., Cechinel-Filho, V. (2001). Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. *Therapie*, **56**(4), 431-4.
- Diaz, J. L. (1976). Índice y sinonimias de las plantas medicinales de México. Monografías Científicas I. Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales A. C., Imeplam, 13-17.
- Dufour, D., Pichette, A., Mshvildadze, V., Bradette, H. M., Lavoie, S., Longtin, A., Laprise, C., Legault, J. (2007). Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *Journal of Ethnopharmacology*, **111**, 22–28.
- Dufour, D., Pichette, A., Mshvildadze, V., Bradette-Hébert, M., Lavoie, S., Longtin, A., Laprise, C., Legault, J. (2007). Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *Journal of Ethnopharmacology*, **111**, 22–28.
- Dvorkin, M. A. y Cardinali, D. P. (2003). Best & Taylor. Bases Farmacológicas de la práctica Médica. España, 13<sup>a</sup> Edición, Editorial Medica Panamericana, 45-72.
- Feelisch, M., Kotsonis, P., Siebe, J., Clement, B. y Schmidt, H. H. (1999). The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3,-a] quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Molecular Pharmacology*, **56**, 243-53.
- Fostermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I. y Kleinert, H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, **23**, 1121-31.
- Fukunaga, T., Nishiya, K., Kajikawa, I., Takeya, K. y Itokawa, H. (1989). Studies on the constituents of *Japanese mistletoes* from different host trees, and their antimicrobial and hypotensive properties, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **37**(6), 1543-6.

- Gaedcke, F., Steinhoff, B., Blasius, H. (2003). Herbal Medicinal Products. Scientific and Regulatory Basis for Development, Quality Assurance and Marketing Authorisation. Medpharm Scientific Publishers. Stuttgart, Germany.
- Galle, J., Zabel, U., Hubner, U., Hatzelmann, A., Wagner, B., Wanner, C. y Schmidt, H. H. (1999). Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity. *British Journal of Pharmacology*, **127**, 195-203.
- Ganong, W. (2006). Fisiología Médica. México, 22<sup>a</sup> Edición, El Manual Moderno, 61-78, 557-559.
- García, J. A. y Hurlé, J. M. (2005). Anatomía Humana. Colombia, 1<sup>a</sup> Edición, McGraw-Hill Interamericana, 583-587.
- Guasch, G. e Hinojosa, L. (2005). Diagnóstico y medicina tradicional. El arte del diagnóstico en las medicinas tradicionales de Asia y América. México, Ocelote, 9-23.
- Guyton, A. C. (2006). Text book of medical physiology. 11<sup>a</sup> Edition, china, El sevier, 92-99.
- Hare, J. M. (2003). Nitric oxide and excitation–contraction coupling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **35**, 719–729.
- Hass, M. A., Nowak, D. M., Leonova, E., Levin, R. M. y Longhurst, P. A. (1999). Identification of components of *Prunus africana* extract that inhibit lipid peroxidation. *Phytomedicine*, **6**, 379-388.
- Hoffman, B. B. (2006). Therapy of hypertension, Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11<sup>a</sup> Edition, McGraw-Hill Interamericana, 845–897.
- Hoki, S., Kimura, T., Nagasawa, M., Kozaki, K. y Terashima, N. (2004). Antihypertensive effects of the principal flavonoids of YAN LONG tea in spontaneously hypertensive rats. *Natural Medicines* (Tokyo, Japan), **58**(3), 113-116.

- Horsley, S. B. y Meinwald, J. (1981). Glucose-1-benzoate and prunasin from *Prunus serotina*. *Phytochemistry*, **20**, 1127-1128.
- Ibarra, M., Pérez-Vizcaíno, F., Cogollado, A., Duarte, J., Zaragoza-Arnáez, F., López-López, J. G. y Tamargo, J. (2002). Cardiovascular effects of Isorhamnetin and Quercetin in isolated rat and porcine vascular smooth muscle and isolated rat atria. *Planta Medica*, **68**, 307-310.
- Ishide, T., Nauli, S. M., Maher, T. M., Ally, A. (2003). Cardiovascular responses and neurotransmitter changes following blockade of nNOS within the ventrolateral medulla during static muscle contraction. *Brain Research*, **977**, 80–89.
- Ito, M., Shimura, H., Watanabe, N., Tamai, M., Hanada, K., Takahashi, A., Tanaka, Y., Arai, I. y Zhang, P. (1990). Hepatoprotective compounds from *Canarium album* and *Euphorbia nematocypa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **38**(8), 2201-3.
- Janicsák, G., Veres, K., Zoltán-Kakasy, A., (2006). Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, **34**, 392-396.
- Janicsák, G., Veres, K., Zoltán, K. A. (2006). Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, **34**, 392-396.
- Jeoung, D., Kim, J., Lee, Y., Baek, M., Lee, S., Baek, N., Kim, H. (2002). cDNA microarray analysis of transcriptional response to hyperin in human gastric cancer cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **12**(4), 664-668.
- Kalant, H. y Roschlau, W. H. E. (2002). Principios de Farmacología Médica. 6ª Edición, México, Oxford University, 444-448.
- Kyoung, M. M., Gill, K. D., Kyong, L. J., Sook, K. J., Sub, L. H. (2006). Vasodilatory and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of rhubarb via a NO-cGMP pathway. *Life Sciences*, **78**, 1550 – 1557.

- Lara, O. F. y Márquez, A. C. (1996). Plantas medicinales de México; composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 27.
- Lee, M. H.; Son, Y. K.; Han, Y. N., (2002). Tissue factor inhibitory flavonoids from the fruits of *Chaenomeles sinensis*. *Archives of Pharmacal Research*, **25**(6), 842-850.
- Lee, S., Jung, S. H., Lee, Y. S. y Shin, K. H. (2003). Hyperin, an aldose reductase inhibitor from *Acanthopanax senticosus* leaves. *Natural Product Sciences*, **9**(1), 4-6.
- Lee, S., Jung, S. H., Lee, Y. S., Yamada, M., Kim, B., Ohuchi, K. y Shin, K. H. (2004). Antiinflammatory activity of hyperin from *Acanthopanax chiisanensis* roots. *Archives of Pharmacal Research*, **27**(6), 628-632.
- Lee, S., Shin, D., Oh, K. y Shin, K. H. (2003). Antibacterial compounds from the leaves of *Acanthopanax senticosus*. *Archives of Pharmacal Research*, **26**(1), 40-42.
- Linares, E., Flores, B. y Bye, R. (1994). Selección de plantas medicinales de México. 1ª Edición, México, Limusa, 10-15.
- Liu, J. (2005). Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, **22**, 92-94.
- Liu, R., Zhang, J., Liang, M., Zhang, W., Yan, S. y Lin, M. (2007). Simultaneous analysis of eight bioactive compounds in Danning tablet by HPLC-ESI-MS and HPLC-UV. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, **43**, 1007-1012.
- López, F. A. Aislamiento de metabolitos bioactivos de *P. serotina* ssp. *capuli*. Tesis para obtener el grado de maestro en Ciencia Químicas, México, Facultadde Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 1999.

- Lozoya, X. (1993). Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI. En la investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana. Secretaría de Salud, México, 255-270.
- Lozoya, X. (1999). Two decades of mexican ethnobotany and research in plant drugs. Research unit in pharmacology of natural products. National Center, Mexican Institute of Social Security, Mexico City Ciba Foundation Symposium, **185**, 130-152.
- Lozoya, X., Meckes, M., Abou-Zaid, M., Tortoriello, J., Nozzolillo, C. y Arnason, J. T. (1994). Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. *Archives of Medical Research*, **25**(1), 11-15.
- Lui, H., Xiong, Z. y Sperelakis, N. (1997). Cyclic nucleotides regulate the activity of L-type calcium channels in smooth muscle cells from rat portal vein. *Journal of Muscular and Cellular Cardiology*, **29**, 1411-1421.
- Mahato, S., Kundu, A. (1994). CNMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids-A Compilation and some Salient Features. *Phytochemistry*, **37** (6), 1517-1575.
- Martínez, M. (1989). Las plantas medicinales de México. México, 6<sup>a</sup> Edición, Botas, 61-63.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M. y Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, **17**(6) 271-278.
- Mata, E. R. y Rivero, C. J. F. (2000). Curso teórico de Farmacognosia. 2<sup>a</sup> Edición, México. Universidad Nacional Autónoma de México, 4-11.
- Mata, R., Rojas, A., Acevedo, L., Estrada, S., Calzada, F., Rojas, I., Bye, R. y Linares, E. (1997). Smooth muscle relaxing flavonoids and terpenoids from *Conyza filaginoides*. *Planta Medica*, **63**, 31-35.
- Mitscher, L. A., Pillai, S. y Shankel, D. M. (2000). Some transpacific thoughts on the regulatory need for standarization of herbal medical products. *Journal of Food and Drug Analysis*, **8**, 229-234.

- Moncada, S. y Higgs, E. A. (1991). Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *European Journal of Clinical Investigation*, **21**, 361-374.
- Morello, S., Vellecco, V., Alfieri, A., Mascolo, N., Cicala, C. (2003). Vasorelaxant effect of the flavonoid galangin on isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences* **78**, 825 – 830.
- Mulcahy, R. (1984). Padecimientos cardiacos. 2ª Edición, México, Fondo Educativo Interamericano, 7-22.
- Nassar, M. I., Gamal-Eldeen, A. M. (2003). Potential antioxidant activity of flavonoids from *Hypericum triquetrifolium* Turra and *Cleome droserifolia* (Forssk.). *Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University)*, **41**(2), 107-115.
- National Institute of Standards and Technology (NIST). <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>, (2006).
- Navarro-Cid, J., Cachafeiro, V., Maeso, R. y Lahera, V. (1999). Fisiología de la pared vascular. En Tresguerras, J. A. F., Aguilar, E., Cachafeiro, M. D. (Eds.). Fisiología Humana. McGraw-Hill Interamericana, México, 525, 532-539.
- NOM-030-SSA2-1999. Norma Oficial Mexicana para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial.
- Nowak, G. A., Gerberding, Co. (1966). Cosmetic and medicinal properties of the birch. *American Perfumer and Cosmetics*, **81**(11), 37-9.
- Ogungbamila, F. O. y Samuelsson, G. (1990). Smooth muscle relaxing flavonoids from *Alchornea cordifolia*. *Acta Pharmaceutica Nordica*, **2**(6), 421-2.
- Olszewska, M. (2005). Flavonoids from *Prunus serotina* Ehrh. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **62**, 127-133.
- Olszewska, M. (2005). High-performance liquid chromatographic identification of flavonoid monoglycosides from *Prunus serotina* Ehrh. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **62**, 435-441.

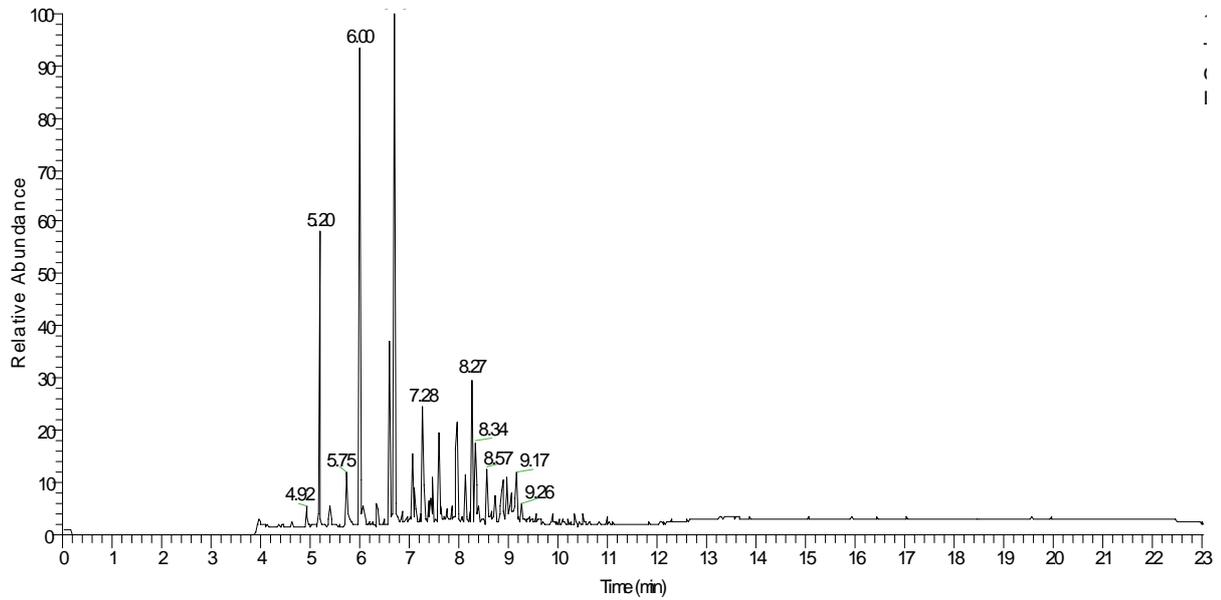
- Ordaz-Galindo, A., Wesche-Ebeling, P., Wrolstad, R. E., Rodriguez-Saona, L. y Argaiz-Jamet, A. (1999). Purification and identification of capulín (*Prunus serotina* Ehrh) anthocyanins. *Food Chemistry*, **65**, 201-206.
- Pérez- Trueba, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de investigación Biomédica*, **22**(1),48-57.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Moore, P. K. (2004). Farmacología. 5ª Edición, España, El Sevier, 285-276, 286-290.
- Risler, N. R., Miatello, R. M. y Cruzado, M. C. (2002). La pared vascular en la hipertensión arterial. *Revista de la Federación Argentina de Cardiología*, **31**, 315-320.
- Rivero, C. B. Compuesto espasmolíticos de *Brickellia veronicaefolia* (Kunt) Gray (Asteraceae). Una contribución para determinar la identidad, composición y eficacia de la droga cruda. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias. México, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
- Rojas, R. A. y Morales, S. M. (2004). Nitric Oxide, an iceberg in cardiovascular physiology: Far beyond vessel tone control. *Archives of Medical Research*, **35**, 1–11.
- Romo de Vivar, A. (1999). Química, Universo, Tierra y Vida. 2ª Edición. La ciencia para todos. Fondo de Cultura Económica, México, No.51.
- Rossoni, G., Manfredi, B., Del Soldato, P., Polvanid, G., Berti, F. (2003). Nitric oxide-releasing aspirin inhibits vasoconstriction in perfused tail artery of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, **477**, 59– 68.
- Rzedowski, J., (1981). Un siglo de botánica en México. Boletín de la Sociedad Botánica de México, **40**.
- Sahai, R., Dube, M. P., Rastogi, R. P.(1981). Chemical and pharmacological study of *Euphorbia maddeni*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **43**(6), 216-19.

- Santamour, F. S. (1998). Amygdalin in *Prunus* leaves. *Phytochemistry*, **47**, 1537-1538.
- Saravanan, R., Viswanathan, P., Viswanathan, P. K. (2006). Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. *Life Sciences*, **78**, 713-718.
- Saravanan, R., Viswanathan, P., Viswanathan-Pugalendi, K. (2006). Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. *Life Sciences*, **78**, 713-718.
- Sardana, S. y Madan, A. K. (2003). Topological models for prediction of antihypertensive activity of substituted benzylimidazoles. *Journal of Molecular Structure*, **638**, 41-49.
- Secretaría de Salud, (2001). COMUNICADO DE PRENSA No. 176.
- Secretaría de Salud, (2001). Guía de Detección Integrada de Diabetes e Hipertensión Arterial.
- Secretaría de Salud, (2002). Coordinación de Vigilancia Epidemiológica INEGI/Secretaría. Dirección general de información en salud, CONAPO, Proyecciones de la población de México 2000-2050.
- Secretaría de Salud, (2006). Bases de datos de defunciones, CONAPO. Proyecciones de población, previas a los resultados del II Censo de Población y Vivienda (2005). <<http://sinais.salud.gob.mx/>>
- Secretaría de Salud, Dirección de Medicina Tradicional y Desarrollo Intercultural, (2004). Fortalecimiento y desarrollo de la medicina tradicional mexicana y su relación intercultural con la medicina institucional. <<http://www.salud.gob.mx/>>
- Song, B. W., Ma, C. G., Xu, S. Y. (1988). Hyperin: a new peripheral analgesic agent. *Asia Pacific Journal of Pharmacology*, **3**(1), 1-5.
- Valdés, J. y Flores, H. (1984). La historia de las plantas de Nueva España. Comentarios a la obra de Francisco Hernández, Universidad Nacional Autónoma de México, 1ª Edición, México, 19-11.

- Verdejo, P. J. (2006). Función endotelial. *Archivos de cardiología de México*, **76** (2), 164-169.
- Waln, K. T. y Poulton, J. E. (1987). Partial purification and characterization of an  $\alpha$ -D-mannosidase from mature seeds of *Prunus serotina* Ehrh. *Plant Science*, **53**, 1-10.
- Wei-Qun, W., Chuan-Geng, M. y Shu-Yun, X. (1996). Protective effect of hyperin against myocardial ischemia and reperfusion injury. *Zhongguo Yaoli Xuebao*, **17**(4), 341-344.
- Xie, Y., Xu, H., Dong, H., Fiscus, R. (2007). Role of nitric oxide in the vasorelaxant and hypotensive effects of extracts and purified tannins from *Geum japonicum*. *Journal of Ethnopharmacology*, **109**, 128–133.
- Xing-Wang, W., Chuan-Geng, M. y Shu-Yun, X. (2000). Hyperin: analgesic. *Drugs of the Future*, **25**(4), 347-350.
- Xiong, Q., Fan, W., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Stampoulis, P., Hattori, M., Namba, T. y Kadota, S. (2000). Hepatoprotective effect of *Apocynum venetum* and its active constituents. *Planta Medica*, **66**(2), 127-133.
- Yi-Ching, L., Huei-Hsia, T., Rong-Jyh, L., Deng-Chyang, W., Bin-Nan, W., Young-Tso, L., Ing-Jun, C. (2005). Endothelium-dependent and independent vasorelaxation by a theophylline derivative MCPT: roles of cyclic nucleotides, potassium channel opening and phosphodiesterase inhibition. *Life Sciences*, **76**, 931–944.
- Yoffe, B., Levy, B., Ben-Alon, D., Baruchin, O., Baruchin, A. (2007). Intra-arterial infusion of nitric oxide (NO)-First animal trial. *Vascular Pharmacology*, **47**, 57–62.
- Yokozawa, T., Dong, E., Kawai, Y., Gemba, M. y Shimizu, M. (1999). Protective effects of some flavonoids on the renal cellular membrane. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **51**(1), 9-14.

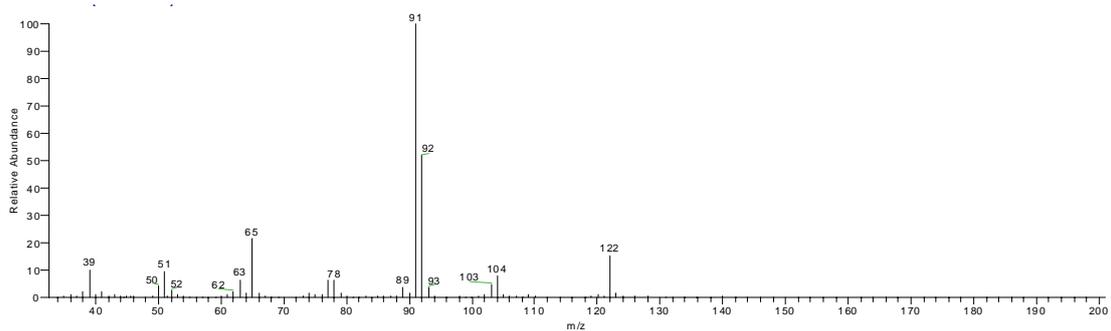
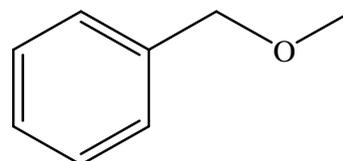
## 9. APENDICE

### Constituyentes del aceite esencial de las hojas de *P.serotina*.

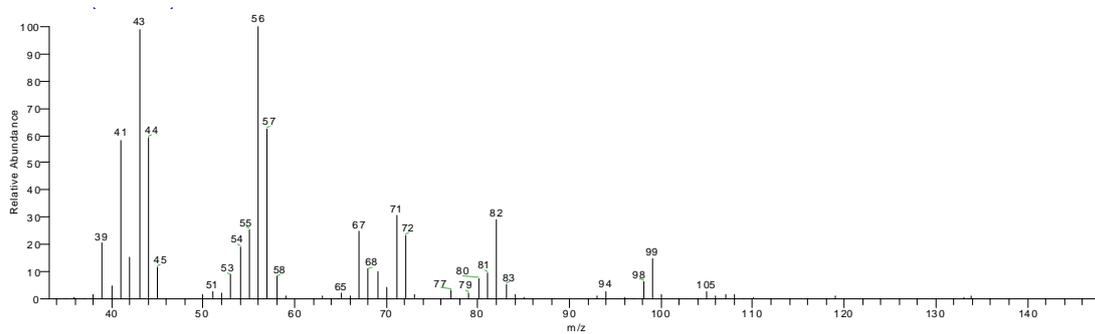


$t_R$  (min)

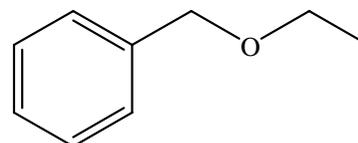
6.70

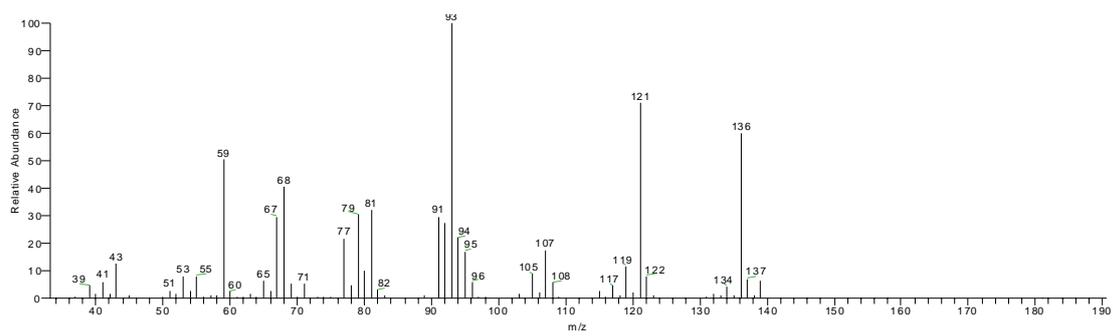


7.07



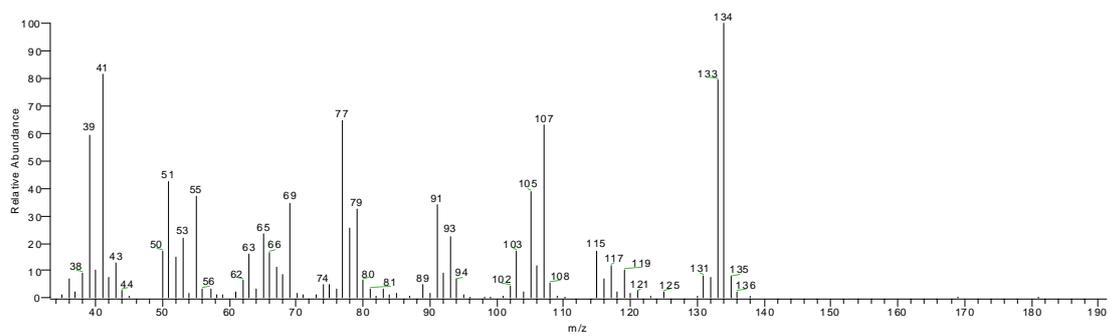
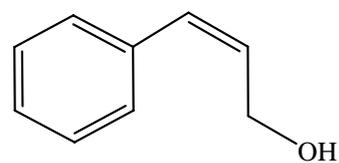
7.28



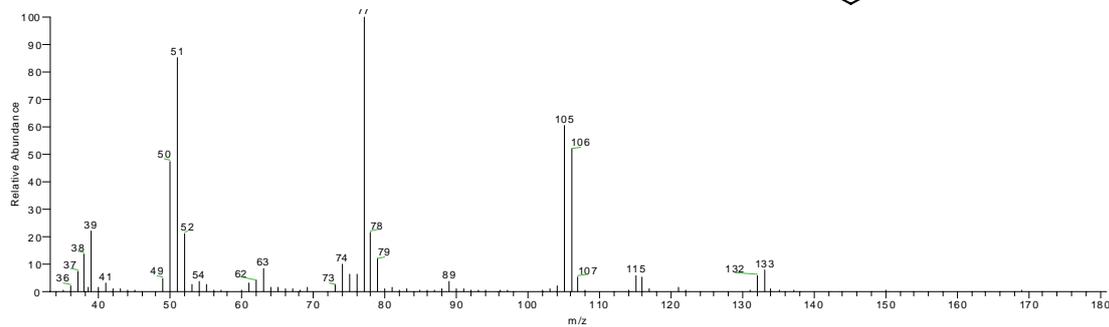
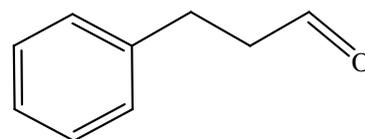


$t_R$  (min)

7.60

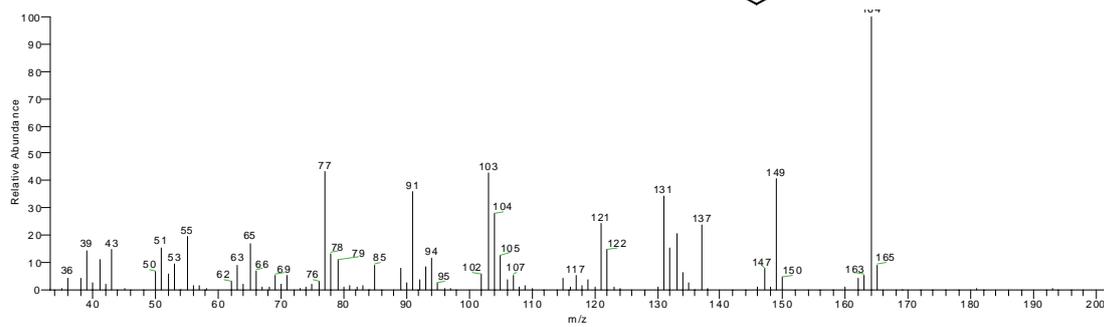
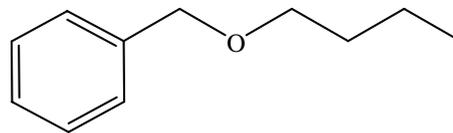


7.97

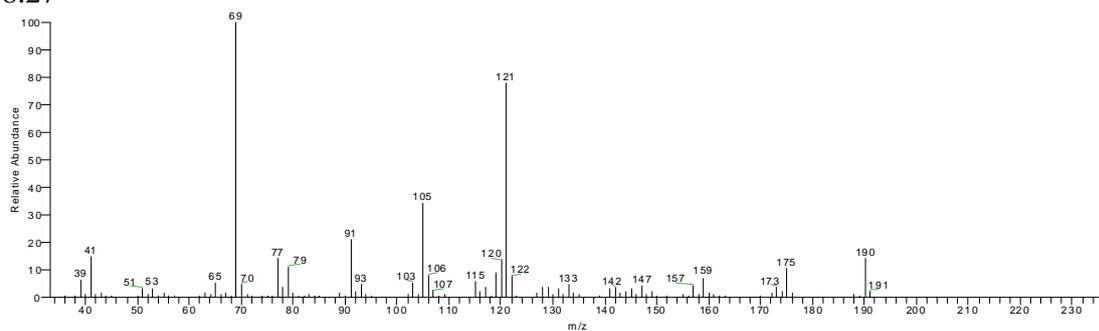


$t_R$  (min)

8.13



8.27



$t_R$  (min)

8.34

