



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO DEL HIPERÓSIDO, COMPUESTO
VASORRELAJANTE MAYORITARIO DE LA INFUSIÓN
DE LAS HOJAS DE *Prunus serotina*.**

T E S I S

Que para obtener el título de

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

LUZ MARIA SOTO AGUILAR



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal:	Dra. Rachel Mata Essayag
Secretario:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. suplente:	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
2do. suplente:	M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz

Sitio donde se desarrolló el proyecto

Laboratorio 111 Edificio E

Facultad de Química UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Luz María Soto Aguilar

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México a la cual estoy muy agradecida por darme la oportunidad de pertenecer a ella y forjarme como profesionista y como ser humano.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por su apoyo, paciencia y enseñanza para la realización de este trabajo.

Al personal técnico de la USAI por el registro de los distintos espectros utilizados en ésta investigación.

Este trabajo se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN208207 e IN205709.

Al Dr. Cesar Ibarra de la Universidad Autónoma de Querétaro por su apoyo en el ensayo biológico.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo y por sus valiosas observaciones para mejorarlo.

DEDICATORIAS

Este esfuerzo se lo dedico a mi familia en especial a mi madre Lucina Aguilar por darme la vida y darme su apoyo para cumplir otra más de mis metas , gracias por todo lo que me has dado y ser uno de mis motores para salir adelante, te quiero mamá.

A mi novio Orlando Reyes por tu paciencia, por tu comprensión, por darme ánimos desde el inicio hasta el fin de este ciclo, por tu cariño durante mi enfermedad por nunca dejarme sola en ese momento y no permitirme dejar la escuela, por compartir buenos y malos momentos, gracias ya que sin ti no sé como habría salido adelante en esta carrera. Nadie como tú, te amo gordo.

También este logro se los dedico a mis otros papas: mi tío Miguel Ángel Aguilar y mi tío Gabriel Aguilar por ser mi motivación desde niña a ser como ustedes, unas personas exitosas en su carrera, los quiero mucho gracias.

A mis amigos Diana Sánchez, Platón Medrano, Francisco Archundia, Irais Vázquez por compartir muchas experiencias juntos los quiero. Y principalmente a Faby que aunque ya estas descansando siempre seguirás siendo mi mejor amigo.

A mis compañeritos de trabajo en especial a Blanca Cruz, Angélica Arias y Carlos Poucell pero en general a todos los compañeros de servicio, estancia y/o futuras tesis que compartieron pláticas y experiencias vividas, gracias por su compañía durante mi estancia en el laboratorio 111, por auxiliarme y sobre todo por hacer una convivencia agradable.

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE CUADROS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE DIAGRAMAS	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Incidencia de enfermedades cardiovasculares en México.	4
2.1.1. Fisiología del endotelio vascular.	7
2.1.2. Mecanismo de producción de NO en la célula endotelial.	9
2.1.3. Prostaciclina.	10
2.1.4. Factor hiperpolarizante derivado de endotelio.	11
2.2. Antecedentes botánicos y etnobotánicos del género <i>Prunus</i> .	12
2.3. Antecedentes botánicos y etnobotánicos de la especie <i>Prunus serotina</i> .	13
2.4. Usos de <i>Prunus serotina</i> .	15
2.5. Antecedentes Químicos de <i>Prunus serotina</i> .	17
2.6. Farmacología de <i>Prunus serotina</i> .	18
2.7. Toxicidad encontrada de <i>Prunus serotina</i> .	18

	Pág.
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	23
4. PARTE EXPERIMENTAL	25
4.1. Procedimientos generales	25
4.1.1. Análisis cromatográficos	25
4.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	26
4.1.3. Material vegetal	26
4.2. Ensayo Biológico	27
4.2.1. Evaluación de la actividad relajante en músculo liso de aorta aislada de rata	27
4.3. Estudio fitoquímico de <i>Prunus serotina</i>	28
4.3.1. Obtención del extracto total de las hojas de <i>Prunus serotina</i>	28
4.3.2. Fraccionamiento primario del extracto total de las hojas de <i>P. serotina</i>	28
4.3.3. Fraccionamiento secundario del extracto AcOEt:butanol de <i>P. serotina</i>	30
4.3.4. Aislamiento del hiperósido (PS-001) a partir de las fracciones secundarias F6 - F10.	31
5. RESULTADOS Y DISCUSION	32
5.1. Análisis estadístico de los resultados del compuesto hiperósido (PS-001).	33
5.2. Determinación del efecto del hiperósido (PS-001) sobre la musculatura lisa arterial de rata aislado de la fracción F6 -F10.	34
5.3. Comparación del efecto relajante producido por el hiperósido (PS-001) con el efecto inducido por la acetilcolina en segmentos intactos de aorta de rata.	35

5.4. Determinación del efecto del hiperósido (PS-001) sobre segmentos de aorta de rata en ausencia de endotelio.	36
5.4.1. Determinación de la activación de la vía del NO/GMPc por el hiperósido (PS-001) empleando segmentos de aorta intacta de rata.	37
5.5. Determinación de la activación de la vía de la PGI ₂ /AMPc por el hiperósido (PS-001) empleando aorta intacta de rata.	39
5.6. Determinación de la participación de la activación de canales de potasio en el efecto relajante producido por el hiperósido (PS-001).	40
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES	42
7. PERSPECTIVAS	43
8. BIBLIOGRAFÍA	44

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AA	Ácido araquidónico.
AC	Adenilato ciclasa
Ach	Acetilcolina
AcOEt	Acetato de etilo
AINES	Anti inflamatorios no esteroideos
Ang II	Angiotensina II
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
Bk	Bradikinina
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CaM	Calmodulina
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico.
°C	Grados Celsius
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
cGMP	Guanosin monofosfato cíclico
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
Cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMLV	Células del músculo liso vascular
Δ	Desplazamiento químico
D	Doblete
Dd	Doble de dobles
DM	Diabetes Mellitus
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDRF	Factor relajante derivado de endotelio.

eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
Ev	Electrón-volts
FAD	Dinucleótido de flavina-adenina
FMN	Flavin mononucleótido
G	Gramo
GCs	Guanilato ciclasa soluble
GTP	Guanosín trifosfato
H	Hora
HA	Hipertensión Arterial
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IP ₃	Inositol trifosfato
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
KCl	Cloruro de potasio
Kg	Kilogramo
L	Litro
µg	Microgramo
µm	Micrómetro
M	Concentración molar
MeOH	Metanol
Mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
Min	Minutos
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mmHg	Milímetros de Mercurio

mM	Milimolar
MHz	Megahertz
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH	Nicotinamida Adenina dinucleótido fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de sodio
Nm	Nanómetro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
O ₂	Oxígeno
ODQ	1H-[1,2,4] oxodiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-ona
OMS	Organización Mundial de la Salud
Ppm	Partes por millón
PDE	Fosfodiesterasas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PGH ₂	Prostaglandina H ₂ .
PGI ₂	Prostaciclina.
PK	Proteínas cinasas
PS	Presión Arterial Sistólica
%	Por ciento
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
Rpm	Revoluciones por minuto
RS	Retículo sarcoplásmico
SSA	Secretaria de Salud
T	Triplete
TEA	Cloruro de Tetraetilamonio
TXA ₂	Tromboxano A ₂
UV	Ultravioleta

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Pág.
1.	Agentes vasodilatadores y agentes vasoconstrictores	8
2.	Metabolitos secundarios obtenidos de la especie <i>Prunus serotina</i>	19
3.	Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatograficos en capa fina.	25
4.	Fraccionamiento secundario de <i>Prunus serotina</i> .	30
5.	EC ₅₀ , E _{max} y potencia del efecto relajante inducido por el hiperósido y la ACh sobre la contracción inducida por fenilefrina en segmentos de aorta intacta de rata.	36

LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Pág.
1.	Mecanismo de producción de NO	10
2.	<i>Prunus serotina</i> (Corteza).	13
3.	<i>Prunus serotina</i> (Hojas).	13
4.	<i>Prunus serotina</i> (Flor).	14
5.	<i>Prunus serotina</i> (Fruto).	14
6.	Estructura del hiperósido	31
7.	Estructura del hiperósido (PS-001).	32
8.	Efecto del hiperósido aislado de la especie vegetal <i>P. serotina</i> sobre el tono del músculo liso vascular.	34
9.	Comparación de las curvas concentración-respuesta del efecto relajante del hiperósido y la ACh en segmentos de aorta intacta de rata.	35
10.	Curvas concentración-respuesta del efecto vasorrelajante producido por el hiperósido en anillos de aorta intacta y en ausencia de endotelio.	37
11.	Curvas concentración-respuesta del efecto vasorrelajante producido por el hiperósido sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta en presencia y en ausencia ODQ.	38
12.	Curvas concentración-respuesta del efecto relajante producido por el hiperósido sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta en presencia y en ausencia de indometacina.	40
13.	Curvas concentración-respuesta del efecto relajante producido por el hiperósido sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta en presencia y en ausencia de TEA.	41

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama	Contenido	Pág.
1.	Fraccionamiento primario de <i>Prunus serotina</i> .	29

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales tienen una gran importancia en el campo de la salud, ya que constituyen una alternativa segura y eficaz para el tratamiento de distintas afecciones y cada vez es mayor el número de pacientes que recurren a ellas como remedio o como complemento a su medicación habitual.

En la prehistoria, los humanos probablemente observando las costumbres de los animales, empezaron a manipular las plantas medicinales como los perros y gatos que utilizan la grama para purgarse; es muy frecuente encontrar tomillo en los nidos de los insectos por su poder desinfectante. El hombre Neanderthal ya utilizaba plantas medicinales. Los conocimientos sobre las plantas medicinales, antes del nacimiento de la escritura, se transmitían oralmente (Mundo Natural Historia de las Plantas Medicinales, 2005).

Las grandes civilizaciones antiguas como la china y la hindú proporcionan escritos como evidencia del ingenio del hombre en utilizar las plantas en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades. En México se han utilizado las plantas desde la época prehispánica para diversas aplicaciones las cuales van desde la alimentación, vestimenta y como remedio (Guasch e Hinojosa 2005; Mitscher *et al.*, 2000).

Asimismo se sabe que México cuenta con una gran variedad de recursos herbolarios. En lo que a plantas medicinales se refiere, se sabe que su transmisión ha sido mediante la lingüística prehispánica la cual es amplia y heterogénea, puesto que son variadas las lenguas o dialectos nativos que mantienen su vigencia y vitalidad a pesar del tiempo transcurrido; ejemplo de lenguas vivas son el quechua, aymará, guaraní, mazateca, guajiro, entre otras (Velarde, 2002).

Después del descubrimiento de América, en el siglo XVI, la imagen que se percibía del mundo tomó un camino distinto; atrayendo el interés de viajeros, cronistas y científicos quienes se encargaron de llevar y convertir en fuentes de

primera mano las crónicas escritas directamente por la población autóctona o descendientes de estos entre los siglos XV y XVII.

En dichas crónicas se resaltan los diversos tratados de herbolaria indígena escritos entre los siglos XVI y XVII. El manuscrito titulado "*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*", de Martín de la Cruz, nativo mexicano educado por religiosos de Tlatelolco, publicado en 1552, contiene información sobre plantas medicinales, posee ilustraciones y nombres náhuatl. A este manuscrito se le conoce como "Códice Badiano" por la traducción al latín que realizó Juan Badiano.

Posteriormente, el fraile franciscano Bernardino de Sahagún presentó el manuscrito "Historia General de las Cosas de la Nueva España", el cual está basado en encuestas sistemáticas, realizadas a un grupo de selectos sabios y médicos nahuas en las cuales recogió información sobre plantas medicinales, creencias y prácticas de la época (Velarde, 2002).

Por otra parte, los escritos del doctor Francisco Hernández, médico enviado por Felipe II hacia los fines del Siglo XVI, con objeto de estudiar la flora medicinal de la "La Nueva España". Este libro denominado "Historia de las Plantas de la Nueva España", agrupa de manera concisa y clara 1500 plantas usadas por los nativos y médicos; describen sus propiedades botánica y curativas.

Años después de consolidada la dominación española en Mesoamérica, autores indígenas de origen maya escribieron los libros de Chilam Balam: Káua, Ixil, Tekax, Nah. Estos libros contienen recetas en idioma maya y español; manuscritos similares han sido encontrados, y aún son objeto de estudio (Velarde, 2002).

En 1565 Nicolás Monardes, médico sevillano, presentó su obra clásica "Historia Medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales".

Obra que consiste de tres tomos que describen las principales propiedades medicinales de las plantas americanas (Velarde, 2002).

En el “Atlas de las Plantas Medicinales de México” se establece que en el país existen alrededor de 30,000 especies de plantas de las cuales aproximadamente 3,000 tienen acción terapéutica y sólo del 1% se han estudiado sus propiedades medicinales (Argueta, 1994). De las especies medicinales resaltan 1000 que se utilizan en la medicina tradicional para tratar enfermedades respiratorias, cardiovasculares, de la piel, desórdenes gastrointestinales, hipertensión, dolor, diabetes, para inducir el sueño y para la inducción de parto (Aguilar, 1994; Lozoya, 1994; Bye, 1995; Lozoya 1999).

Las enfermedades cardiovasculares constituyen uno de los principales problemas de salud en México, lo que ha motivado la búsqueda de nuevos tratamientos. En este sentido las plantas medicinales representan una de las alternativas para el tratamiento de padecimientos cardiovasculares los cuales se encuentran entre las primeras causas de muerte en México; dentro de este padecimiento podemos encontrar como principales factores la hipertensión arterial, dislipidemias, obesidad y el consumo de tabaco (SSA, 2009).

En la literatura herbolaria de México se destacan plantas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares dentro de las cuales están las siguientes especies: *Chiranthodentron penthadactylon*, *Talauma mexicana*, *Prunus serotina* y *Lepechinia caulescens* (Argueta, 1994).

2. ANTECEDENTES

2.1 Incidencia de enfermedades cardiovasculares en México.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que las enfermedades cardiovasculares representan la causa más frecuente de mortalidad en el ámbito mundial, rebasando a la mortalidad ocasionada por enfermedades infecciosas y parasitarias. Asimismo, reconoce que las enfermedades cardiovasculares avanzan rápidamente tanto en los países desarrollados como en los que se encuentran en vías de desarrollo (SSA, 2009).

Las enfermedades cardiovasculares incluyen un grupo de afecciones del aparato circulatorio, entre las que se destacan la enfermedad isquémica del corazón, la enfermedad cerebro-vascular y la enfermedad hipertensiva. Las dos primeras constituyen las causas de morbilidad y mortalidad circulatoria más frecuentes y comparten junto con la enfermedad hipertensiva y la aterosclerosis, factores de riesgo comunes que pueden ser identificados tempranamente y sobre los cuales se puede intervenir favorablemente, lo que facilita su prevención y control (SSA, 2009).

Según cifras de la Escuela Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2006), en México la prevalencia de la Hipertensión Arterial Sistémica (HAS) en la población mayor de 20 años es de 30.8% y es mayor en los estados del norte del país (Nayarit, Zacatecas, Sinaloa, Coahuila, Baja California Sur, Durango y Sonora), en donde alcanza cifras de 35%. A partir de los 60 años la prevalencia se incrementa y más del 50% de los hombres y casi del 60% de las mujeres padecen HAS.

La HAS es una enfermedad crónica, controlable de etiología multifactorial, que se caracteriza por un aumento sostenido en las cifras de la presión arterial sistólica (PS) por arriba de 140 mm Hg, y/o de la presión arterial diastólica (PD) igual o mayor a 90 mm Hg (SSA, 2009).

Dependiendo de los factores asociados a su desarrollo, la HAS puede clasificarse como esencial primaria y secundaria (SSA, 2006).

Las HAS primarias representan entre el 90-95% de los casos y son de etiología multifactorial y se relacionan con:

- Antecedentes hereditarios de hipertensión
- Sobrepeso y obesidad
- Sedentarismo
- Estrés mental
- Hábitos alimenticios: consumo excesivo de alimentos ricos en sodio y bajos en potasio, pobre ingesta de frutas y verduras
- Abuso en el consumo de alcohol y drogas
- Tabaquismo

Otros factores de riesgo que precipitan la aparición de HAS en individuos mayores de 30 años son:

- Uso de ciertos medicamentos (vasoconstrictores, antihistamínicos, esteroides, AINES)
- Diabetes mellitus (DM)
- Síndrome cardiometabólico

Únicamente son secundarias el 5-10% de los casos, y están asociadas a las siguientes causas:

- Apnea del sueño
- Insuficiencia renal crónica
- Aldosteronismo primario
- Enfermedad renovascular
- Feocromocitoma
- Coartación de la aorta
- Enfermedad tiroidea o paratiroidea
- Terapia con esteroides o síndrome de Cushing

La hipertensión arterial es un importante factor de riesgo de las enfermedades cardiovasculares y renales. La mortalidad por estas complicaciones ha mostrado un incremento sostenido durante las últimas décadas. Las enfermedades del corazón, la enfermedad cerebro-vascular y las nefropatías se encuentran entre las primeras causas de muerte (NOM 030 SSA2-1999).

El problema de la hipertensión arterial se ha detectado con mayor incidencia en personas adultas con edades que oscilan entre los 45 y 49 años respectivamente, aunque también se tienen datos que la incidencia de dicha enfermedad es dos veces mas en países del primer mundo representando esto un problema entre hombres y mujeres por igual.

En cifras presentadas por la OMS se muestra que en el mundo se invierten mas de 50 mil millones de dólares para diagnosticar y combatir este grave problema; mientras que en países en vías de desarrollo que presentan el 80% de incidencia de hipertensión arterial en el mundo, solo se dispone de un 10% (cerca de 12 mil millones de dólares) para este fin.

México por su parte invierte en tratar este padecimiento, cerca de 2.5 millones de dólares anuales, cifra que representa aproximadamente medio punto del producto interno bruto del país. Aunque a pesar de los esfuerzos e inversión realizada anualmente, se tienen datos que menos del cuatro porciento de los mexicanos que padecen hipertensión arterial están controlados o en vías de tratamiento

(Alcocer, 2009).

La hipertensión arterial afecta a más de 20 millones de adultos en México, de los cuales 10 millones además de la presión elevada, tienen alguna otra complicación y menos del 10 por ciento están controlados adecuadamente.

México es un país donde la hipertensión no es un problema resuelto. Se calcula que 17.5 millones de hipertensos no están recibiendo el tratamiento adecuado o no siguen las indicaciones de su médico (Alcocer, 2009).

2.1.1 Fisiología del endotelio vascular.

El endotelio es una capa unicelular que cubre la superficie interna de los vasos sanguíneos y conforma la pared de los capilares. La integridad estructural y funcional de las células endoteliales es importante en el mantenimiento de la pared de los vasos y de la función circulatoria.

Las células endoteliales son dinámicas y tienen funciones tanto metabólicas como sintéticas. Además, ejercen acciones autocrinas, paracrinas, endocrinas e influyen en las células del músculo liso vascular (CMLV), plaquetas y leucocitos periféricos (Sánchez, 2007).

El endotelio está constituido por células altamente especializadas y bastante heterogéneas. Además, no sólo expresan diferentes antígenos de superficie y receptores sino que pueden generar distintas respuestas al mismo estímulo (Gallagher, 1997).

Las células endoteliales ejercen numerosas funciones biológicas, entre las que destacan el mantenimiento de una interfase sangre-tejido no trombogénica, la regulación del tono vascular, del flujo sanguíneo tisular y de la presión arterial (Sánchez, 2007).

El endotelio es considerado un tejido esencialmente paracrino en relación al tono vascular, ya que tiene la capacidad de sintetizar mediadores biológicos que modulan el estado de contracción y/o relajación del músculo liso adyacente. El endotelio sintetiza tanto agentes vasodilatadores como agentes vasoconstrictores. En el Cuadro 1 se resumen los agentes vasodilatadores y vasoconstrictores conocidos (Vanhoutte, 1993).

Cuadro 1. Agentes vasodilatadores y agentes vasoconstrictores.

Vasodilatadores	Vasoconstrictores
Oxido nítrico (NO)	Endotelina
Factor hiperpolarizante derivado del Endotelio (EDHF)	Angiotensina II
Prostaciclina (PGI ₂)	Tromboxano A ₂ (TXA ₂)
Bradicinina	Endoperóxidos
Acetilcolina (Ach)	Prostaglandina H ₂ (PGH ₂),
Serotonina (5-HT)	Superóxido
Histamina	
Sustancia P	
Péptido natriurético tipo C.	

El endotelio es indispensable para la homeostasis corporal y en muchos procesos patológicos incluyendo la aterosclerosis, la hipertensión, la hipertensión pulmonar, la sepsis y los síndromes inflamatorios, se ha descrito una respuesta alterada de las células endoteliales. Estas enfermedades están relacionadas con lo que se denomina daño, activación o disfunción endotelial (Gallagher, 1997).

La relajación del músculo liso vascular en respuesta a una señal iniciada por la estimulación del endotelio, es conocida hoy en día como “relajación dependiente del endotelio” y está relacionada con la liberación de al menos un factor relajante derivado de endotelio (EDRF). Los tres factores vasodilatadores producidos por el endotelio son el óxido nítrico (NO), la PGI₂ y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF), siendo el principal el NO, ya que es el único que ejerce un efecto tónico vasodilatador sobre la pared vascular (Sánchez, 2007).

2.1.2 Mecanismo de producción de NO en la célula endotelial.

El NO es una pequeña molécula gaseosa que actúa como mediador en numerosos procesos biológicos. Se produce a partir del grupo guanidino de la L-arginina, siendo el otro producto de esta reacción biológica la L-citrulina. La óxido nítrico sintetasa (NOS) es la enzima que cataliza esta reacción. Esta enzima es una hemoproteína que, además del sustrato, requiere oxígeno molecular (Leone, 1991), la presencia de calmodulina (CaM) y cuatro cofactores: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida) (NADPH), dinucleótido de flavina-adenina (forma oxidada) (FAD), flavin mononucleótido (forma oxidada) (FMN) y tetrahidrobiopterina (BH₄) (Stuehr, 1997).

La activación de receptores endoteliales de la acetilcolina, produce un aumento en la entrada de calcio (Ca²⁺) por canales específicos, lo que se traduce en un incremento de la concentración de inositol trifosfato (IP₃).

El IP₃ causa la liberación de Ca²⁺ desde el retículo endoplasmático (RE). Este aumento intracelular de Ca²⁺ activa a la Calmodulina (CaM), que a su vez activa a la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), que a partir de L-arginina (L-Arg) produce óxido nítrico (NO). El NO sale por difusión pasiva de la célula endotelial y entra de igual forma en célula del músculo liso vascular (CMLV), donde activa a la guanilato ciclasa soluble (GCs). Se forma así el guanosin monofosfato cíclico (cGMP) a partir de guanosín trifosfato (GTP). El guanosín monofosfato cíclico (cGMP) puede disminuir la actividad de fosfodiesterasas (PDE), con lo que aumenta la concentración de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) al no ser degradado por éstas. El guanosín monofosfato cíclico (cGMP) puede activar diversas proteínas cinasas (PK), lo que causa la disminución de la concentración intracelular de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i), debido a la inhibición de su entrada por canales tipo L de Ca²⁺, a su mayor salida mediante el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ y a su mayor acumulación en el retículo sarcoplásmico (RS). El guanosín monofosfato cíclico (cGMP) también activa canales de K⁺ estimulando su salida. Todos estos efectos del cGMP tendentes a reducir la [Ca²⁺]_i, producen la relajación de la fibra muscular, y con ello la vasodilatación. En la Figura 1 se ilustra el mecanismo para la producción de NO.

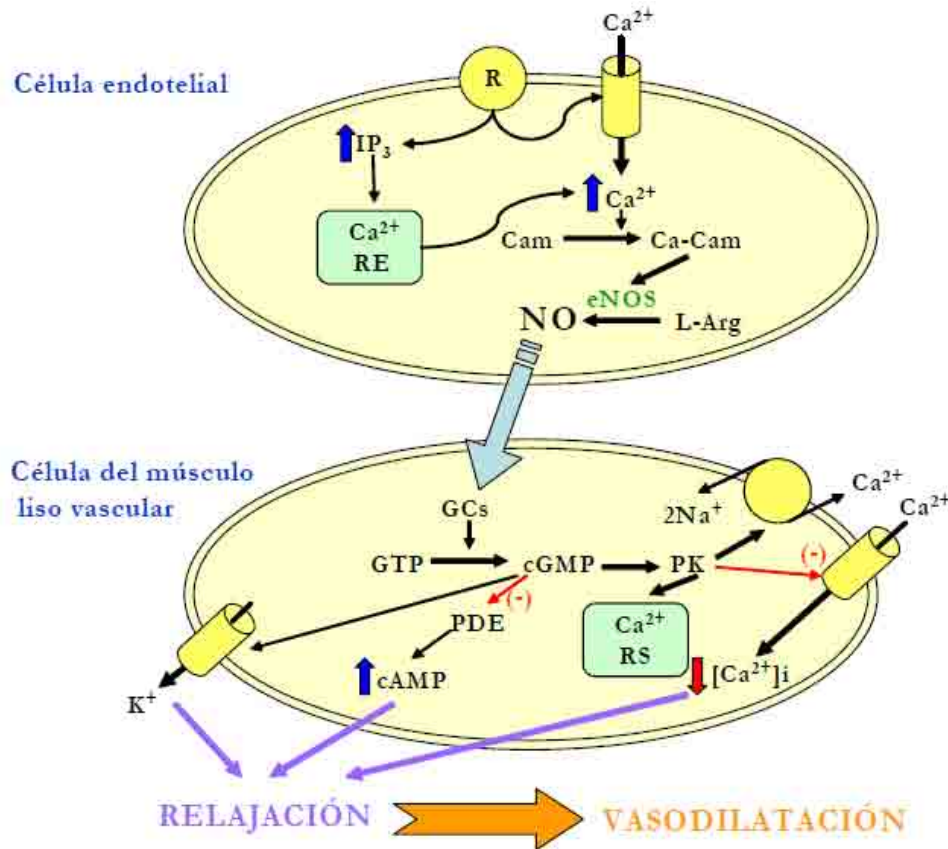


Figura 1. Mecanismo de producción de NO (-): Inhibición. : Aumento : Disminución (Sánchez, 2007).

2.1.3 Prostaciclina.

La prostaciclina (PGI_2) fue el primer factor relajante derivado de endotelio (EDRF) que se identificó. Se caracterizó en tiras de tejido aórtico a mediados de los años sesenta, como una sustancia capaz de inhibir la activación y la agregación plaquetaria y producir vasodilatación (Moncada, 1976).

La PGI_2 se sintetiza fundamentalmente en las células endoteliales vasculares a partir del ácido araquidónico (AA) mediante la acción del complejo enzimático COX- PGI_2 sintetasa. También se sintetiza en la célula del músculo liso vascular (CMLV) y plaquetas, donde contribuye a regular el estado de agregación

plaquetaria. Parte de la acción de la PGI₂ se debe a su unión a receptores específicos en la superficie de las células del músculo liso vascular (CMLV) que se encuentran acoplados a través de proteínas G a la adenilato ciclasa (AC), lo que conduce a un aumento de los niveles intracelulares de cAMP (adenosin monofosfato cíclico) y a la consiguiente relajación del músculo liso (Vanhoutte, 1993; Furchgott, 1989; Hajjar *et al.*, 1982; Gorman *et al.*, 1977; Best *et al.*, 1977). Entre los factores que estimulan la síntesis y liberación de PGI₂ están la angiotensina II (Ang II), la acetilcolina (ACh) o la bradisinina (Bk), así como productos derivados de las plaquetas como la serotonina y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). El NO y la PGI₂ actúan de forma sinérgica para producir tanto la relajación de las fibras de músculo liso vascular como para inhibir la agregación plaquetaria (Moncada, 1978).

2.1.4 Factor hiperpolarizante derivado de endotelio.

El factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) se encarga de hiperpolarizar el músculo liso vascular mediante la activación de los canales de K⁺ sensibles al ATP o Na⁺-K⁺ 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, 2003; Rang *et al.*, 2004). Este ácido proviene de la hidrólisis de fosfolípidos de la membrana catalizada por la enzima fosfolipasa A₂. La actividad de esta enzima se eleva cuando se incrementa la concentración de Ca²⁺ citosólico ([Ca²⁺]_i). Por lo tanto, todo estímulo que aumente la [Ca²⁺]_i 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 Ca²⁺ a la célula, por lo tanto; la disminución en la [Ca²⁺]_i provocando la relajación del músculo (Rang *et al.*, 2004).

2.2 Antecedentes botánicos y etnobotánicos del género *Prunus*.

Las plantas agrupadas en la familia Rosaceae a la cual pertenece *Prunus* presentan las siguientes características botánicas: una semilla con dos cotiledones, una flor con cinco pétalos libres, estambres numerosos con Atenas introna.

Dentro de la familia Rosaceae se distinguen cuatro grupos dependiendo de las características del pistilo y del receptáculo:

- Rosaceas con numerosos carpelos fijos sobre un receptáculo ambobado (fresal)
- Rosaceas con un solo carpelo fijo en el receptáculo hundido y caduco (ciruelo, cerezo y melocotonero)
- Rosaceas con numerosos capelos fijos en el fondo de un receptáculo hundido y persistente (Rosal salvaje o escaramujo, arbustillo enano)
- Rosaceas con cinco carpelos soldados en un receptáculo hundido (manzano)

Habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado. Los frutos del genero se han utilizado en la medicina tradicional coreana para el tratamiento cardiaco, mareos, mastitis, dolores de dientes así como para la destoxicacion, relajación y como antitusivo (Sánchez, 2000).

Algunos ejemplos de especies del género *Prunus* son: *P. persica* (durazno), *P. domestica* (ciruelo), *P. armeniaca* (chabacano) y *P. serotina* (capulín), entre otros (Calderón, 2001).

2.3 Antecedentes botánicos y etnobotánicos de la especie *Prunus serotina*.

Prunus serotina es comúnmente conocido como capulín (Ordaz *et al.*, 1999). El capulín por pertenecer al género de las cerezas negras, se le asemeja mucho en apariencia y sabor a estas. Es redondo y brillante, su pulpa es verde pálido, carnosa y jugosa de sabor dulce y algo astringente, contiene una sola semilla de mayor proporción que la pulpa con una almendra de sabor amargo en su interior, su piel es delgada pero lo suficientemente firme para poder ser transportada sin que se rompa (Sánchez, 2000).

El árbol tiene copa ancha de forma ovoide que produce una sombra densa, tiene una altura de 10 a 15 m, la corteza es de una coloración rojiza o café (Figura 2), con tronco largo y recto en el bosque, pero en los claros es corto y ancho de hojas lanceoladas y aserradas (Figura 3), con flores de color blanco que se agrupan en racimos (Figura 4), su fruto es globuloso de color negro o rojo, de 1.5 cm de diámetro con semilla (Figura 5) y fructifica entre los meses de mayo a agosto (Argueta, 1994; Lara *et al.*, 1996).



Figura 2. *Prunus serotina* (corteza).

Figura 3. *Prunus serotina* (hojas).



Figura 4. *Prunus serotina* (flor).



Figura 5. *Prunus serotina* (fruto).

La semilla es esférica y rodeada por un endocarpio o hueso leñoso (almendra) de sabor amargo. La raíz es un sistema radical que se presenta de forma superficial y extendida a medianamente profunda. La mayoría de las raíces ocupan los primeros 60 cm del suelo. La raíz crece muy rápido y presenta una sexualidad hermafrodita (Sánchez, 2000).

Se desarrolla sobre pendientes acentuadas y se le encuentra en zonas de cultivo (cafetal). Habita en muchos lugares templados y fríos de la República Mexicana.

Es intolerante a la sombra. Se establece bien después de perturbaciones como fuego, tala y ciclones. Los tipos de vegetación en donde se encuentra son: bosque de encino, bosque de pino, bosque de pino-encino, bosque mesófilo de montaña (cerca de su límite superior) y pastizales (vegetación sabanoide) (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Los suelos en los que abunda esta especie son: pedregosos oscuros, someros, profundo con abundante materia orgánica, regosol eútrico, cambisol, acrisol órtico, toba andesítica, ácido, húmedo. Se distribuye ampliamente por 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 *et al.*, 1996).

El capulín cuenta con otros nombres con los que se conoce entre ellos están: capoli (Mex), capolín (Mex y Puebla), capulín, capulín blanco, ceraso (BCS), cerezo (Chis), chencua y chengua (purépecha), cusabi (Taraumara), detse y ghoto (otomí), jeco y guasiqui (guarigio), pa ksmuk (mixe), pate y chimal-ma-u (chontal), sacaton (Jal). T-mundaya (Mixteco), tunday (zapoteco), tzu'uri (cora) y usabi (tarahumara) (Lara *et al.*, 1996). También cuenta con regionalismos: Nayarit (agualamo), Jalisco (aguilote), Oaxaca (capulina), México (saracuacho) (Sánchez, 2000).

En EU los frutos se conocen como black o cherry, “cerezo” en Guatemala, “cerezo criollo” en Venezuela y “cerezo de los Andes” en Colombia (Chávez, 1990).

2.4 Usos de *Prunus serotina*.

En los Estados de Michoacán, Hidalgo, Morelos, Aguascalientes y Estado de México utilizan el fruto para preparar jarabe; el cual se toma a cucharadas y se recomienda ingerir una infusión de las hojas cada ocho horas para el tratamiento de la tos (Argueta, 1994; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

En el Distrito Federal utilizan las hojas para preparar un té para el tratamiento de la diarrea y el cocimiento de la raíz, otra forma de utilización es la combinación de la corteza, las hojas junto con la miel de abeja para el tratamiento de dolor abdominal, también se llega a utilizar el té de las hojas, aunque suele acompañarse con hojas de durazno, tejocote y manzana (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

En el estado de Sonora las hojas y la corteza son utilizadas en el tratamiento de la diarrea, catarro, nubes en los ojos, y fiebres periódicas; el cocimiento de las hojas puesto al sol se utiliza para el tratamiento de las “cámaras” de sangre.

En cuanto al fruto se sabe que su cocimiento es utilizado en el “mal de orín” y por último, las hojas son utilizadas también como antiespasmódico (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

En los Estados de Veracruz, Michoacán, Chiapas y el Distrito Federal, se recomienda esta planta para problemas digestivos y de la bilis, para lo cual se prepara un cocimiento que se ingiere por la mañana; también ayuda a mejorar la digestión y fortalecer el estómago, mediante la cocción endulzada con miel de abeja, que debe tomarse tres veces al día después de comer, o bien, por la mañana beber como té el cocimiento mezclado con mirto y albahaca. Otros usos comunes son para tratar la tos y gripa, en los cuales se recomienda tomar como té la infusión resultante de las hojas hervidas (Argueta, 1994).

Durante el siglo XVI Martín de la Cruz lo describe para el tratamiento de la dermatosis, dispepsia y como agente antipuriginoso. 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, disminuye las inflamaciones de los ojos y suaviza la lengua reseca por exceso de calor.

A finales del siglo XIX la Sociedad Mexicana de Historia Natural lo menciona como antipalúdico (Argueta, 1994; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). Durante el siglo XX Alfonso Herrera lo señala como sedativo y narcótico. Maximino Martínez describe los siguientes usos: antidiarreico, antiespasmódico, antipalúdico, para el tratamiento de la neumonía, enfermedades respiratorias y para tratar la disentería (Martínez, 1989; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

La Sociedad Farmacéutica de México lo describe como antidiarreico, astringente, para tratar gastritis atónica, sedante cardiaco, sedante de la circulación y sedante en catarros bronquiales, laríngeos y tónicos (Argueta, 1994; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Las semillas contienen de un 30% o 40 % de aceite semisecante apropiado para la elaboración de jabones y pinturas (Sánchez, 2000).

El capulín presenta madera de buena calidad, fácil de labrar y que adquiere color rojizo y brillante al pulirla. Es usada para construcciones rurales, decoración de interiores y carpintería en general.

El producto del capulín más apreciado es el fruto, pues es comestible en fresco, en jaleas, dulces regionales, mermeladas, tamales y para preparar licores. El fruto contiene 20 por ciento de azúcar y mucha pectina (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

La corteza de capulín contiene glicósidos cianogénicos, en particular prunasina. Estos glicósidos, una vez degradados en el organismo, calman los espasmos del músculo liso que rodea a los bronquiolos, aliviando la tos (Health, 2008).

En algunos estados de la república adquiere otros usos, por ejemplo en Morelos, Hidalgo y en el Estado de México se usa el capulín en arreglos y amuletos para protegerse del mal.. También se usa para realizar limpiezas agregando un manojo de plumas de chupamirto moradas, rojas y azules. Cuando el caso no es muy grave, el manojo se pasa por todo el cuerpo del paciente sin quitarse la ropa, en caso contrario, las hierbas se tienen que desmenuzar y restregar directamente sobre el cuerpo, para dejar la piel impregnada con la savia (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

2.5 Antecedentes químicos de *Prunus serotina*.

Estudios químicos realizados previamente sobre la especie *Prunus serotina* demuestran el aislamiento e identificación de metabolitos pertenecientes a la categorías de flavonoides, terpenoides glicósidos cianogénicos y compuestos fenolicos simples, de los cuales los dos primeros se presentan en el Cuadro 2.

Se han identificado en las hojas de *Prunus serotina* los siguientes compuestos: aceite esencial, grasa sólida, resina ácida de funciones glucosidicas, 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, de igual forma se han identificado los triterpenos urs-12-en-28-al-3-beta-ol, los compuestos aromáticos β -D-

glucopiranosil benzoato y prunasina (Argueta, 1994). Mientras que la corteza, contiene almidón, resinas, taninos, ácido gálico, materia grasa leñosa, materia colorante roja, cal, hierro y potasa (Martínez, 1989).

2.6. Farmacología de *Prunus serotina*.

El extracto fluido preparado a partir de la corteza, mostró actividad biológica frente a la cepa patógena *Mycobacterium tuberculosis*, obteniéndose un valor de 6.2 mg/ml para la mínima concentración inhibitoria (CMI).

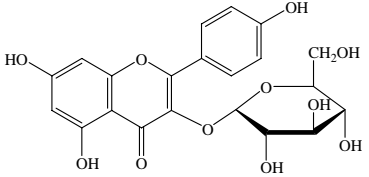
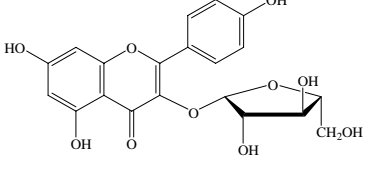
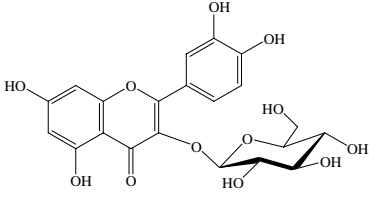
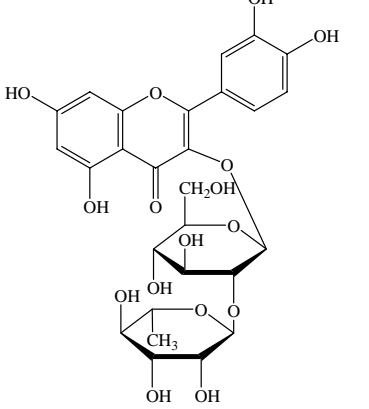
En la Farmacopea Mexicana de 1896, se indica la aplicación de la corteza en infusión a la dosis de 4g en 500ml de agua como antidisentérica, y a la dosis de 1 a 2g en 500 ml de agua como antipirética (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

2.7. Toxicidad encontrada de *Prunus serotina*.

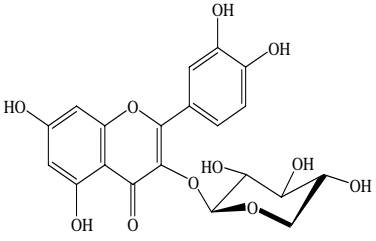
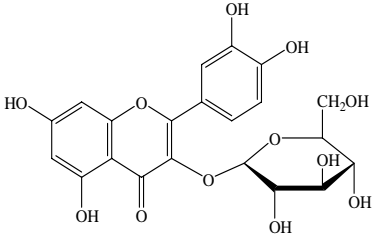
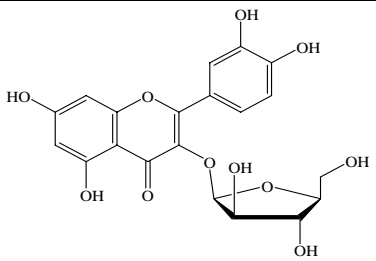
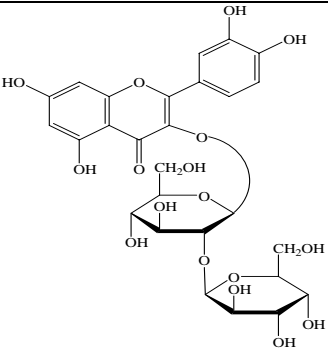
Las hojas de la planta, al ser ingeridas por el ganado vacuno, han provocado una serie de síntomas de intoxicación que en ocasiones ha llevado a la muerte a los animales, los que presentan dificultad en la respiración, dilatación de las pupilas, pérdida de la conciencia, convulsiones y parálisis total, antes de la muerte.

Se han reportado intoxicaciones en humanos provocadas por esta planta. Los síntomas más frecuentes que manifiestan los sujetos que la han ingerido, pueden ser dificultad en la respiración, espasmos, coma y muerte repentina. Se considera que esta planta, la especie más peligrosa del género *Prunus*, es tan tóxica, que con una cantidad menor de una libra de follaje puede llegar a ser fatal si es ingerida por los animales y el hombre. Los niños suelen intoxicarse con ella al ingerir las semillas (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

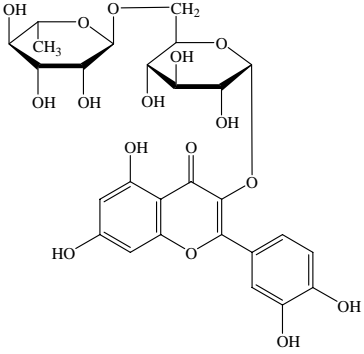
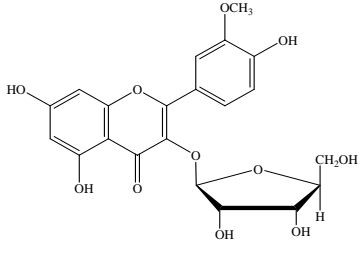
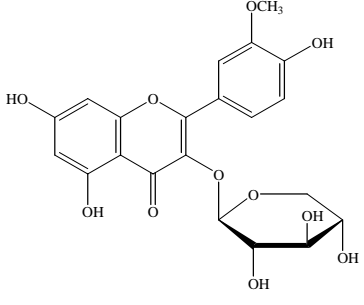
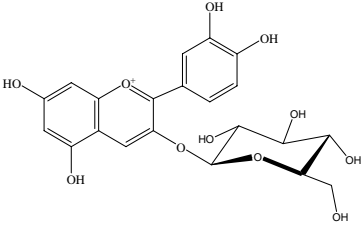
CUADRO 2. Metabolitos secundarios obtenidos de la especie *Prunus serotina*.

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

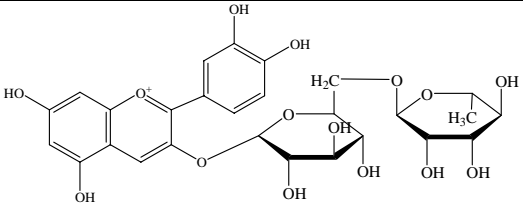
CUADRO 2. Metabolitos secundarios obtenidos de la especie *P. serotina* (continuación).

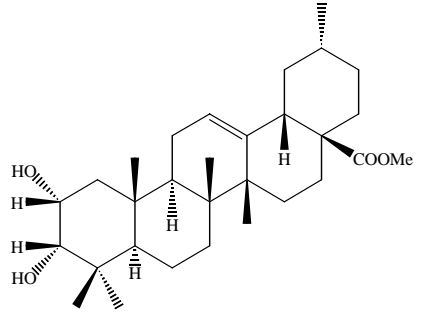
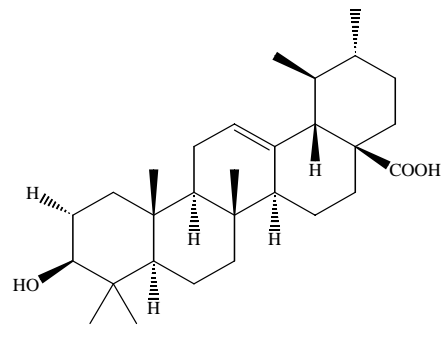
Estructura	Nombre	Referencia
Flavonoides		
	<p>3-O-α-L- arabinopiranosido de quercetina (guaijaverina) (5)</p>	<p>Olszewska <i>et al.</i>, 2005</p>
	<p>3-O-β-D-glucopiranosido de quercetina (isoquercetrina) (6)</p>	<p>Olszewska <i>et al.</i>, 2005</p>
	<p>3-O-α-L-arabino furanosido de quercetina (avicularina)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

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

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

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

Estructura	Nombre	Referencia
Flavonoides		
	<p>3-O-rutinósido de cianidina (13)</p>	<p>Ordaz <i>et al.</i>, 1999</p>

Estructura	Nombre	Referencia
Triterpenoides		
	<p>2α,3α-dihidroxiurs-12-en 28-ato de metilo (14)</p>	<p>Biessels <i>et al.</i>, 1974</p>
	<p>ácido ursólico (15)</p>	<p>Biessels <i>et al.</i>, 1974 Hass <i>et al.</i>, 1999 Shengmin <i>et al.</i>, 2002</p>

3. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Las plantas medicinales tienen una gran importancia en el campo de la salud, ya que estas constituyen una opción segura y eficaz para el tratamiento de distintas afecciones y cada vez es mayor el número de pacientes que recurren a las plantas como alternativa a su medicación habitual. Un claro ejemplo de la utilización de plantas medicinales en el tratamiento de algún padecimiento, lo encontramos dentro de la literatura herbolaria de México en la especie *Prunus serotina*, utilizada para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial. Esta enfermedad representa un problema de salud pública en el mundo, y México no es la excepción ya que en el país es una de las principales causas de muerte. En la medicina convencional existen tratamientos para la hipertensión arterial, sin embargo, son caros, presentan numerosos efectos colaterales. Por las razones antes mencionadas existe la necesidad de buscar nuevos compuestos que demuestren mayor seguridad y efectividad que los ya existentes en el mercado para el tratamiento de este padecimiento. Evidencias científicas han demostrado que en las plantas medicinales existe una fuente importante de nuevos compuestos y que el conocimiento etnomédico es un criterio útil para seleccionar las plantas a estudiar.

El capulín (*Prunus serotina*) es conocido en la medicina tradicional de nuestro país como remedio para tratar la tos, enfermedades respiratorias y problemas cardiovasculares. De manera adicional, estudios previos realizados utilizando el extracto acuoso de las hojas del capulín y como modelo farmacológico la aorta de rata han permitido cuantificar el efecto relajante de la infusión sobre el músculo liso arterial por medio de un mecanismo dependiente de endotelio (Pérez *et al.*, 2002; Ajay *et al.*, 2003).

Con base en lo anterior el objetivo primordial es el aislamiento de los compuestos con actividad relajante sobre el músculo liso de la aorta de rata y para el cumplimiento del objetivo general de este proyecto se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1.- Aislar los compuestos bioactivos de las hojas de la especie *Prunus serotina* mediante la aplicación de procedimientos fitoquímicos convencionales.
- 2.- Evaluar la actividad vasorrelajante del compuesto en el modelo de la aorta aislada de rata.
- 3.- Determinar la estructura molecular del compuesto aislado mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

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 F254 Merck, malla 3.5-7.0 ASTM de 0.25 mm de espesor). Los compuestos se visualizaron con luz UV de longitud de onda corta (254nm) y larga (365nm) y mediante la aplicación de un agente cromógeno adecuado (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 (CCA) se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck con tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM, o bien con Sephadex LH-20, empacado en columna de vidrio (4.5 x 50 cm) y utilizando diversos sistemas de elución.

CUADRO 3. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Agente revelador	Composición	Referencia
Anisaldehído sulfúrico	1ml de anisaldehído 2 ml de H ₂ SO ₄ concentrado. 100 ml de ácido acético glacial.	(Colin, 2003)
Vainillina sulfúrica	1 g de vainillina 1 ml de HCl 100 ml de MeOH	(Gaedcke <i>et al.</i> , 2003)

4.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Los análisis espectroscópicos y espectrométricos se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), de la Facultad de Química UNAM.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN¹H, 400 MHz) y de carbono 13 (RMN¹³C, 100 MHz) se generaron en el equipo Varian modelo VNMRS, utilizando CDCl₃ como disolvente y tetrametilsilano como referencia para los desplazamientos químicos expresados en ppm. Los espectros de masas por impacto electrónico de 70 eV se obtuvieron con el equipo LECO modelo Pegasus 4D con analizador másico TOF (Tiempo de Vuelo), por introducción en cromatógrafo de gases (CG-EM) marca Agilent modelo 6890N con una columna capilar DB-5MS (5% Fenil-metilsilicón) de 10 m de longitud y 0.18 mm de diámetro interno con un espesor de película de 0.18 µm.

4.1.3 Material Vegetal.

El material vegetal, hojas del árbol del capulín fue recolectado en la localidad de Pedro de Escobedo, Estado de Querétaro (México) en Agosto del 2004. Se depositó la muestra de la especie en el Herbario de Querétaro (QMEX), localizado en la facultad de ciencias naturales. Universidad de Querétaro. En esta etapa se contó con la participación de los Doctores Mahinda Martínez y Jerzy Rzedowski.

4.2 Ensayo Biológico.

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

Se emplearon ratas de la cepa Wistar (ambos sexos, 250-300 gr), 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 CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 30 mM NaHCO₃, 1.2 mM NaH₂PO₄, 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, 1994). En algunos casos el endotelio se removió mecánicamente (Galle *et al.*, 1999; Ibarra *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 95% O₂ / 5% CO₂.

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 gr y se dejó equilibrar por alrededor de 90 min. Una vez que el tejido alcanzó el equilibrio, los segmentos se pre-contrajeron con KCl (100 mM) durante 15 min 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 gr. Una vez estabilizado el tejido, los segmentos de aorta se contrajeron con fenilefrina (1 µM).

El hiperósido se evaluó en un rango de concentraciones de 1 µg/ml a 1,000 µg/ml. Las diferentes concentraciones del compuesto se disolvieron en agua tridestilada y se adicionaron a las cámaras de tejido aislado 20 min después de haber inducido la contracción de la aorta con la fenilefrina. La respuesta inducida por cada una de las concentraciones en la aorta, se registró durante un período de 10 min. Los cambios en la tensión producidos por los extractos y compuestos puros 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 concentración alcanzada al adicionar la fenilefrina (Feelisch *et al.*, 1999).

4.3 Estudio fitoquímico de *Prunus serotina*.

4.3.1 Obtención del extracto total de las hojas de *Prunus serotina*.

Para la preparación del extracto total se utilizaron 292 g de hojas secas de capulín fragmentadas, las cuales fueron extraídas con 700 ml de hexano durante 2 horas a través de una extracción Soxhlet, posteriormente se preparó la infusión utilizando H₂O durante 2 horas. Los extractos se filtraron y se concentraron al vacío, obteniendo un extracto de color café verdoso.

4.3.2 Fraccionamiento primario del extracto total de las hojas de *Prunus serotina*.

La infusión se sometió a un fraccionamiento primario mediante un proceso de partición utilizando como disolventes hexano y AcOEt:butanol (1:1). Este procedimiento se resume en el Diagrama 1.

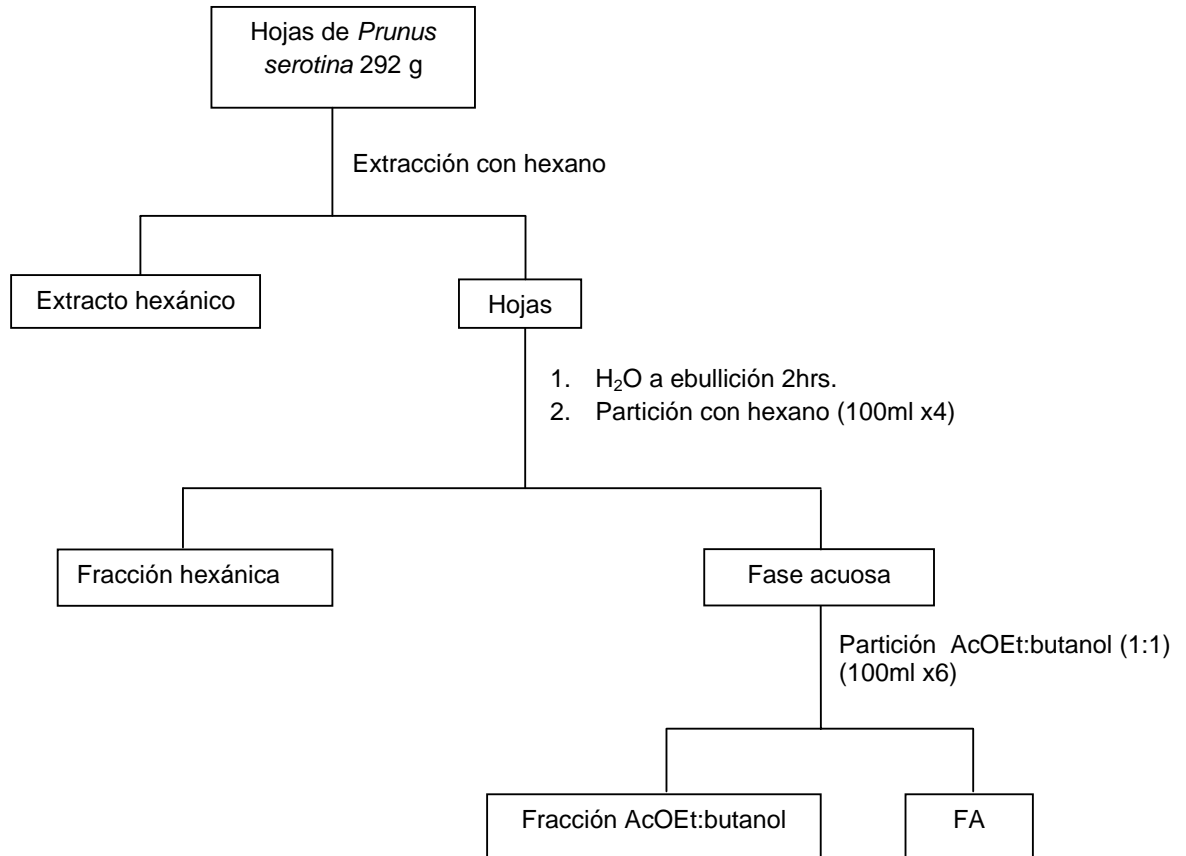


Diagrama 1. Fraccionamiento primario de *Prunus serotina*.

4.3.3 Fraccionamiento secundario del extracto AcOEt:butanol de *Prunus serotina*.

La fracción AcOEt:butanol (30.4 g) se sometió a un fraccionamiento secundario utilizando una columna Sephadex-LH-20 (4.5 x 50cm) y como fase móvil metanol, colectando fracciones de 50 ml cada una. Este procedimiento permitió la obtención de 20 fracciones, de las cuales se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica generando un conjunto de 11 fracciones combinadas. En el Cuadro 4 se resume este procedimiento.

Cuadro 4. Fraccionamiento secundario de *Prunus serotina*.

Eluyente	Proporción %	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave
Metanol	100	1	1	F1
		2	2-5	F2
		3		
		4		
		5		
		6	6	F3
		7	7-9	F4
		8		
		9		
		10	10	F5
		11	11-12	F6
		12		
		13	13-14	F7
		14		
		15	15	F8
		16	16	F9
		17	17-18	F10
		18		
		19	19-20	F11
		20		

4.3.4 Aislamiento del hiperósido (PS-001) a partir de las fracciones secundarias F6 - F10.

Las fracciones secundarias F6-F10 cristalizó un sólido de color amarillo con un punto de fusión 235-236 °C (123.0 mg). El compuesto PS-001 se identificó como hiperósido por comparación directa con una muestra auténtica.

Hiperósido [3-O- β -galactósido de quercetina]: IR, KBr, ν cm^{-1} : 3430 (OH quelatado), 2900 (C-H, alifático), 1655 (C=O quelatado), 1607 (CH=CH aromático), 1086 (C-O); RMN¹H, (300 MHz, DMSO- d_6): δ_{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'); RMN¹³C (75 MHz DMSO- d_6): δ_{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⁺ m/z (int. rel.): 465 [M+H]⁺ (C₂₁H₂₀O₁₂) (6), 303 (C₁₅H₁₀O₇) (18), 289 (13.5), 176 (10.5), 154 (100), 136 (67), 107 (18.0).

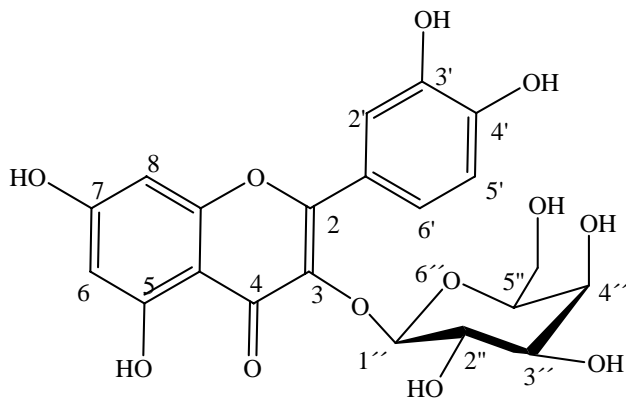


Figura 6. Estructura del hiperósido.

5. RESULTADOS Y DICUSIÓN

Los productos naturales constituyen una fuente alternativa muy valiosa en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas, como por ejemplo los flavonoides que son sustancias naturales que muestran una amplia gama de actividades farmacológicas (Middleton, 1984; Gabor, 1986; Pathak *et al.*, 1991).

La especie *Prunus serotina* fue seleccionada con base en el criterio etnomédico de acuerdo a los usos descritos dentro de la medicina tradicional para el tratamiento de la tos, gripa, dolor abdominal así como los reportes de la época prehispánica como antiespasmódico entre otros, además de que en investigaciones anteriores se ha comprobado que las hojas de *Prunus serotina* contienen compuestos que ayuda al relajamiento de la musculatura lisa vascular (Pérez *et al.*, 2002).

Se realizó el estudio fitoquímico de la infusión de las hojas de *Prunus serotina* con el propósito de aislar los principios vasorrelajantes, dicho estudio se enfocó a la fracción de AcOEt:butanol que fue la que presentó la mejor actividad en el ensayo biológico utilizando la aorta aislada de rata (EC_{50} = 316 μ g/ml, con un 60% de relajación).

El presente estudio químico de la fracción de AcOEt:butanol permitió el aislamiento y la caracterización del compuesto activo hiperósido (PS-001). En la Figura 7 se muestra la estructura del compuesto aislado.

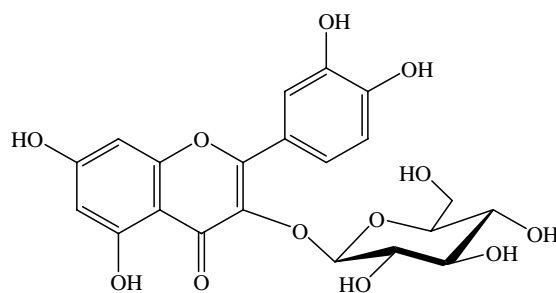


Figura 7. Estructura del hiperósido (PS-001).

5.1 Análisis estadístico de los resultados del compuesto hiperósido (PS-001).

Se realizaron de 4 a 6 evaluaciones para cada una de las concentraciones de las sustancias de prueba. Los resultados son expresados como el promedio \pm el error estándar del promedio (S.E.M.).

Los datos experimentales generados en cada evaluación se ajustaron a una ecuación sigmoideal y graficaron mediante el programa PRISMA 5.0 Graph Pad (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA USA) para la obtención de las curvas concentración-respuesta. En cada caso se calculó la EC_{50} .

La EC_{50} , definida como la concentración de sustancia de prueba ($\mu\text{g/mL}$) necesaria para producir el 50% de la relajación máxima sobre el tejido precontraído con fenilefrina, fue utilizada para evaluar la variación del efecto relajante en las diferentes condiciones de valoración de las curvas concentración respuesta.

Estos resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa estadístico J.M.P. 8.0.1., seguido por la prueba de Tukey para evaluar la diferencia significativa entre las medias. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con $P \leq 0.05$.

5.2 Determinación del efecto del hiperósido (PS-001) sobre la musculatura lisa arterial de rata aislado de la fracción F6 -F10.

En estudios previos, se ha reportado que los flavonoides relajan el músculo liso arterial por medio de un mecanismo dependiente de endotelio (Pérez *et al.*, 2002), sugiriendo que el efecto relajante era causado mediante una estimulación de la vía del NO/GMPc (Ajay *et al.*, 2003).

En congruencia con la literatura en esta tesis se observó que el hiperósido, un galactosido de la quercetina, indujo la relajación dependiente de la concentración ($EC_{50} = 91.3 \pm 14.1 \mu\text{g/ml}$; efecto máximo ($E_{\text{max}} = 92.3 \pm 7.7\%$), de segmentos intactos de la aorta aislada de rata (Figura 8).

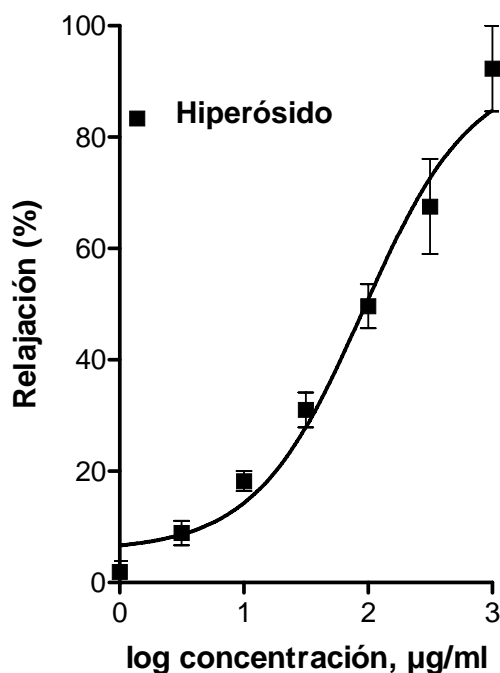


Figura 8. Efecto del hiperósido aislado de la especie vegetal *P. serotina* sobre el tono del músculo liso vascular.

5.3 Comparación del efecto relajante producido por el hiperósido (PS-001) con el efecto inducido por la acetilcolina en segmentos intactos de aorta de rata.

La comparación del efecto relajante del hiperósido con el efecto producido por la acetilcolina (ACh), un activador de la vía del NO/GMPc que depende de endotelio, sobre los segmentos intactos de aorta, indicó que el flavonoide aislado de *P. serotina* posee un efecto relajante aproximadamente diez veces menor que la ACh ($EC_{50} = 8.7 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$). Sin embargo, la eficacia del hiperósido resultó ser significativamente mayor que la presentada por la ACh ($E_{\text{max}} = 69.5 \pm 5.7\%$) (Figura 9). El E_{max} , la EC_{50} y la potencia de la ACh y del hiperósido se muestran en el Cuadro 5.

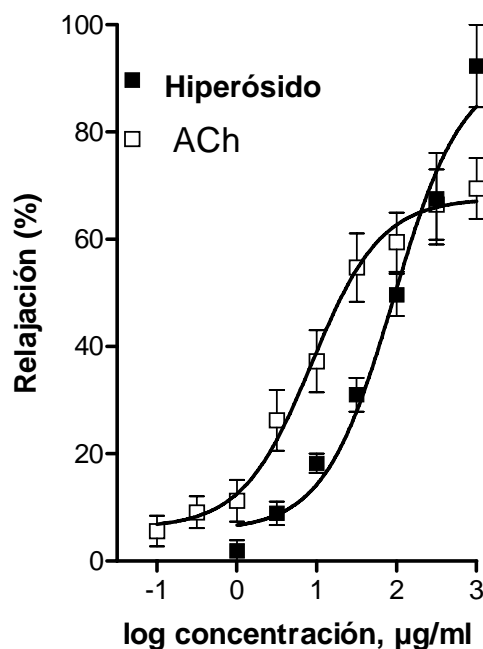


Figura 9. Comparación de las curvas concentración-respuesta del efecto relajante del hiperósido y la ACh en segmentos de aorta intacta de rata.

Cuadro 5. EC_{50} , E_{max} y potencia del efecto relajante inducido por el hiperósido y la ACh sobre la contracción inducida por fenilefrina en segmentos de aorta intacta de rata.

Compuesto	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	E_{max} (%)	Potencia
ACh	8.7 ± 0.8	69.5 ± 5.7	10.5
Hiperósido	91.3 ± 14.1	92.3 ± 7.7	1

5.4 Determinación del efecto del hiperósido (PS-001) sobre segmentos de aorta de rata en ausencia de endotelio.

Para determinar, si el hiperósido interacciona con receptores en las células endoteliales o directamente con receptores localizados en la célula muscular lisa, se evaluó el efecto de este compuesto sobre la aorta aislada de rata en ausencia de endotelio vascular. Los resultados de estos experimentos indicaron que el efecto vasodilatador de este flavonoide es producido principalmente mediante un mecanismo que depende de la presencia de endotelio, ya que la eliminación de este tejido produjo una disminución significativa del efecto vasodilatador este compuesto (Figura 10). Sin embargo, el hecho que el efecto vasodilatador no fuera completamente eliminado en segmentos de aorta sin endotelio, sugirió que el compuesto vasoactivo es capaz de relajar la aorta por un mecanismo alternativo, el cual no requiere de la presencia del endotelio vascular.

5.4.1 Determinación de la activación de la vía del NO/GMPc por el hiperósido (PS-001) empleando segmentos de aorta intacta de rata.

La vía bioquímica del NO/GMPc que contribuye a la relajación vascular involucra la activación, inducida por un incremento en el calcio intracelular, de la óxido nítrico sintetasa endotelial (NOS III), lo cual origina un incremento en los niveles del NO. El NO activa a su proteína receptora, la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs), lo cual resulta en una elevación de los niveles de GMPc (Murad, 1994). El aumento en los niveles intracelulares de GMPc relaja el músculo liso vascular, mediante varios mecanismos que dan como resultado una disminución en los niveles de Ca^{2+} intracelular y una disminución en el grado de fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina (Lucas *et al.*, 2000).

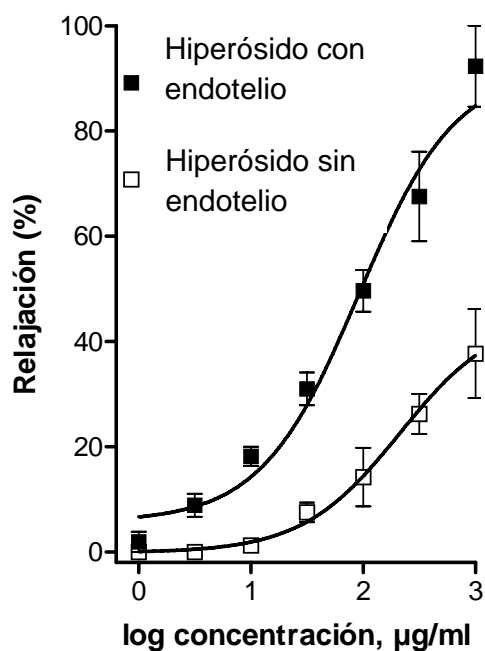


Figura 10. Curvas concentración-respuesta del efecto vasorrelajante producido por el hiperósido en anillos de aorta intacta y en ausencia de endotelio.

Se determinó el papel que juega la activación de la vía NO/GMPc en el efecto relajante producido por el hiperósido. Para llevar a cabo este experimento, se construyó la curva concentración-respuesta del efecto vasodilatador de este flavonoide, sobre la contracción inducida por fenilefrina, en presencia y en ausencia, del inhibidor específico de la GCs, ODQ.

Los resultados obtenidos de estos experimentos mostraron que la hiperósido es capaz de activar la vía del NO/GMPc, ya que la inhibición de la proteína GCs desplazó la curva concentración-respuesta de este compuesto a la derecha (Figura 11). Estos resultados sugieren que el efecto vasodilatador producido por la hiperósido se debe, al menos en parte, a la activación de la vía del NO/GMPc.

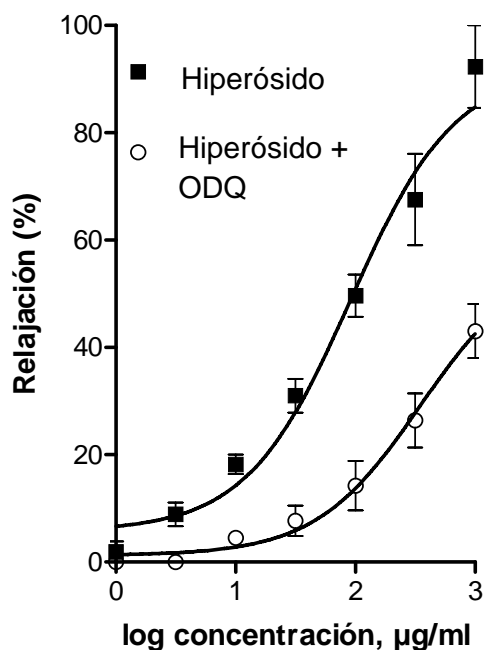


Figura 11. Curvas concentración-respuesta del efecto vasorrelajante producido por el hiperósido sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta en presencia y en ausencia ODQ.

5.5 Determinación de la activación de la vía de la PGI₂/AMPc por el hiperósido (PS-001) empleando aorta intacta de rata.

La otra vía bioquímica importante que regulan la relajación del músculo liso vascular es la vía de la prostaciclina (PGI₂)/AMPc. Esta vía involucra la activación de la enzima ciclooxigenasa, la cual cataliza la síntesis de PGI₂, la cual activa receptores membranales en la célula muscular lisa. La estimulación de los receptores a PGI₂ promueve la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC), lo cual da como resultado un incremento en los niveles de AMPc y, por tanto, de la relajación del músculo liso vascular (Rasmussen, 1990).

Para determinar si la relajación producida por el hiperósido, involucraba también la activación de esta vía bioquímica, se construyó la curva concentración-respuesta del extracto en presencia de indometacina, un inhibidor de la enzima ciclooxigenasa.

El resultado de este experimento indicó que esta vía no participa en el efecto relajante producido por el hiperósido, ya que la inhibición de la ciclooxigenasa no modificó, de manera significativa, la curva concentración-respuesta de este flavonoide (Figura 12).

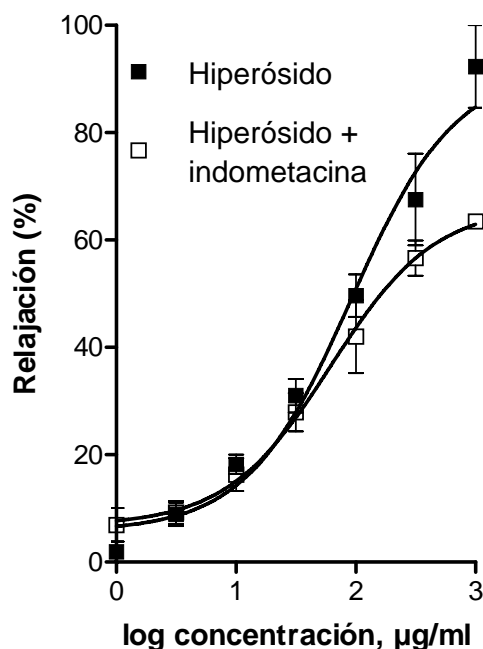


Figura 12. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante producido por el hiperósido sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta en presencia y en ausencia de indometacina.

5.6 Determinación de la participación de la activación de canales de potasio en el efecto relajante producido por el hiperósido (PS-001).

El músculo liso vascular posee varios tipos de canales de potasio, los cuales representan blancos farmacológicos muy importantes. Moléculas pequeñas sintéticas o de origen natural capaces de abrir estos canales podrían ser útiles para tratar diversas enfermedades cardiovasculares. Este tipo de moléculas podrían complementar los fármacos dilatadores ya existentes, para ofrecer una mayor cantidad de posibilidades para el manejo clínico de la hipertensión (Calderone *et al.*, 2004). Para determinar si la activación de canales de potasio estaba involucrada en el efecto relajante producido por la hiperósido, se construyó la curva concentración-respuesta del hiperósido en presencia de cloruro de tetraetilamonio (TEA), un bloqueador no selectivo de canales de potasio (Figura 13).

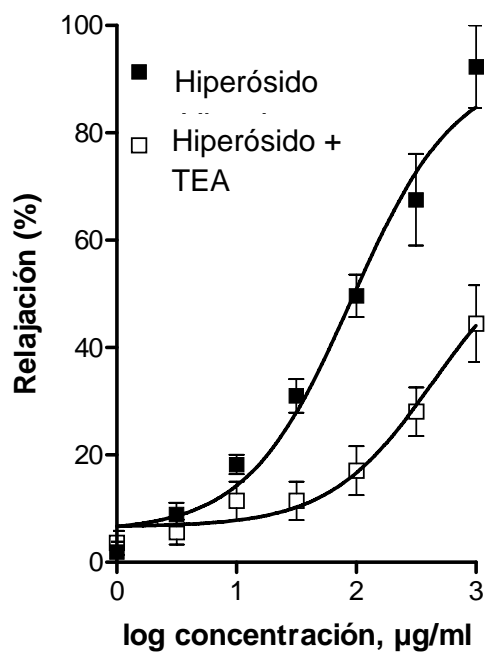


Figura 13. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante producido por el hiperósido sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta en presencia y en ausencia de TEA.

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El presente estudio químico realizado a la especie de *Prunus serotina* permitió contribuir al conocimiento de los principios vasorrelajantes de esta planta medicinal, utilizada ampliamente en las practicas medicas tradicionales.

Se ha reportado por otros grupos de investigación que varios flavonoides son capaces de modular el tono vascular (Chen *et al.*, 1996; Guerrero *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2002). De igual forma un estudio comparativo anterior de siete flavonoides químicamente relacionados (favonoles, flavonas, y de flavanoles) encontraron que el orden de la potencia para relajar las contracciones es la siguiente: flavonoles > flavonas > flavonoides (Duarte *et al.*, 1993).

El hiperósido es uno de los componentes mayoritarios de las hojas ya que se encuentra de manera suficiente en la materia prima y se puede identificar y cuantificar por medio de técnicas analíticas convencionales (Martínez, 2007); y de acuerdo al efecto observado se concluye, que la vasorrelajación inducida por los principios activos de *P. serotina* es dependiente de endotelio e involucraba la liberación de factores endoteliales vasorrelajantes, tales como el óxido nítrico (NO) o la prostaciclina (PGI₂).

Por lo que los resultados del análisis realizado en esta tesis apoyan la utilización de los extractos de *Prunus serotina* en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares tales como la hipertensión.

7. PERSPECTIVAS.

La investigación y resultados obtenidos en esta tesis han generado las siguientes perspectivas:

- a) Continuar el estudio fitoquímico de las fracciones primarias obtenidas que no se analizaron en el presente proyecto.
- b) Continuar con la caracterización química de los compuestos minoritarios de otras fracciones de AcOEt:butanol.
- c) Identificar los compuestos minoritarios presentes en las fracciones activas.
- d) Continuar evaluando el efecto vasorrelajante de otros compuestos.

8. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, A., Camacho, J. R. (1994). Plantas medicinales del herbario. 1ª Edición, México. Instituto Mexicano del Seguro Social, 60-61.
- Ajay, M., Gilani, A., Mustafa, M. (2003). Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta, **74**, 603-12. 2003.
- Alcocer, Impact Report, (2009).
<http://www.medicinadigital.com/index.php?option=com_content&view=article&id=12753:en-el-mundo-ocurren-177-millones-de-muertes-al-ano-relacionadas-con-ecv-impact-report&catid=96:patologias&Itemid=400086>
- Argueta, A. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Tomo I (1-583). México: Instituto Nacional Indigenista, pp 457 y 458.
- Best, L., Martin T., Russel R., Preston F. (1977). Prostacyclin increases cyclic AMP activity in platelets. *Nature*, **267**, 850-852.
- Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. (2009).
<<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Capulín&id=7046>> .
- 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.
- Bye, R. (1995). Phytochemistry of medicinal plants. *Recent advances in Phytochemistry*, **29**, 65-82.
- Calderón de Rzedowski G. y J. Rzedowski. (2001). Rosaceae. In: Flora fanerogámica del valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. p 233 Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Calderone, V., Chericoni, S., Martinelli, C., Testai, L., Nardi, A., Morelli, I., Breschi, M. C. & Martinotti, E. (2004). Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naunyn*

Schmiedebergs Arch Pharmacol, 370(4): 290-8.

- Center, Mexican Institute of Social Security, Mexico City Ciba Foundation Symposium, 130-152.
- Chávez, Z. C. (1990). Variabilidad fenotípica de capulín en base a caracteres de variación y fructificación. Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- Chen, C.K. & Pace-Asciak, C.R. (1996). Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *Gen Pharmacol*, **27**, 363-6.
- Cingolani, H. E. y Houssay, A. B. (2000). Fisiología humana de Houssay. 7ª Edición, Buenos Aires, El Ateneo, 247-243.
- Colin F. P. (2003). The Essence of Chromatography. Elsevier. Amsterdam.
- Duarte J., Perez-Vizcaino F., Utrilla P., Jimenez J., Tamargo J. and Zarzuelo A. (1993) Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. *Structure-activity relationships*, **24**, 857-862.
- Dvorkin, M. A. y Cardinali, D. P. (2003). Best & Taylor. Bases Farmacológicas de la práctica Médica. España, 13ª Edición, Editorial Medica Panamericana, 45-72.
- Feelisch, M., Kotsonis, P., Siebe, J., Clement, B. & 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, **56**, 243-53.
- Forstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I. & Kleinert, H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, **23**, 1121-31.
- Furchgott R., Vanhoutte P. (1989). Endothelium-derived relaxing factor and contracting factor, **3**, 2007-2018.
- Gabor M. (1986). Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships. Alan R. Liss, New York. 471.

- 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.
- Gallagher G., Sumpio. (1997). Vascular endothelial cells. In: Sumpio BE, Sidawy AS, eds. Basic Science of Vascular Disease. 151-186.
- Galle, J., Zabel, U., Hubner, U., Hatzelmann, A., Wagner, B., Wanner, C. & Schmidt, H.H. (1999). Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity. *Br J Pharmacol*, **127**, 195-203.
- Gorman R., Bunting S., Miller O. (1977). Modulation of human platelet adenylate cyclase by prostacyclin. *Prostaglandins*, **13**, 377-388.
- Guasch e Hinostroza L. (2005). Diagnóstico y medicina tradicional. El arte del diagnóstico en las medicinas tradicionales de Asia y América. México. Ocelote, 9-23.
- Guerrero, M.F., Puebla, P., Carron, R., Martin, M.L. & San Roman, L. (2002) Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. *J Pharm Pharmacol*, **54**, 1373-1378
- Hajjar D., Weksler B., Falcone D., Hefron J., Tack-Goldman K., Minick CR. (1982). Prostacyclin modulates cholesteryl ester hydrolytic activity by its effects on cAMP in rabbit aorta, **70**, 479-485.
- 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.
- Health notes. (2008).
<<http://www.vitaminworld.com/pages/healthnotes.asp?xs=&productid=23&ContentID=2183004>>.

- Ibarra C., Rojas A., Luna F. Rojas I., Rivero B. y Rivero F. (2009). Vasorelaxant constituents of the leaves of *Prunus serotina* "Capulín".164-173.
- Lara, O. F. y Márquez, A. C. (1996). Plantas medicinales de México; composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 27.
- Leone Am, Palmer RMJ, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS. (1991) Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline, **266**, 23790-23795.
- 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.
- 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.
- Lucas, R., Casapullo, A., Ciasullo, L., Gomez-Paloma, L. & Paya, M. (2003). Cycloamphilectenes, a new type of potent marine diterpenes: inhibition of nitric oxide production in murine macrophages. *Life Sci*, **72**, 2543-2552.
- Martínez, M., (1989). Las Plantas Medicinales de México, México, 6^{ta} Edición, Botas, 61-63.
- Martínez, V. A., (2007). Estudio químico y biológico de la infusión y del extracto hexánico de las hojas de *Prunus serotina* Ehrh.49.
- Middleton E. Jr. (1984) The flavonoids. *Trends Biol. Sci.* **5**,335-338.

- Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, **52**,673-751.
- Mitscher, L. A., Pillai, S y Shankel, D.M.,(2000). Some transpacific thoughts on the regulatory need for standardization of herbal medical products. *Journal of Food and Drug Analysis*, **8**, 229-234.
- Moncada S, Gryglewski RJ, Blunting S, Vane JR. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to unstable substance that inhibits platelet aggregation, **263**,663-665.
- Mundo natural historia de las plantas medicinales. (2005). <<http://www.mexicoarmado.com/archive/index.php/t-21068.html>>.
- NOM-030-SSA2-1999. Norma Oficial Mexicana para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial.
- NOM-037-SSA2-2002, Norma Oficial Mexicana para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias.
- 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 Argáiz-Jamet, A. (1999). Purification and identification of capulín (*Prunus serotina* Ehrh) anthocyanins. *Food Chemistry*, **65**, 201-206.
- Pathak K., Path ak A. and Singla A. (1991) Flavonoids as medical agents. *Fitoterapia*, **62**, 371-389.

-
- Perez-Vizcaino, F., Ibarra, M., Cogolludo, A.L., Duarte, J., Zaragoza-Arnaez, F., Moreno, L., Lopez-Lopez, G. & Tamargo, J. (2002). Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther*, **302**, 66-72.
 - Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Moore, P. K. (2004). Farmacología. 5ª Edición, España, Elsevier, 285-276, 286-290.
 - Rasmussen, H., Kelley, G. & Douglas, J.S. (1990). Interactions between C^{a2+} and cAMP messenger system in regulation of airway smooth muscle contraction. *Am J Physiol*, **258**, 279-288.
 - Secretaría de Salud, (2006). Boletín de Práctica Médica efectiva.
 - Secretaría de Salud, (2009). Programa Nacional de Salud.
 - Sánchez M. (2000). Estudio químico de *Prunus serotina* Ehrh.6-15.
 - Sánchez M. (2007). Efectos preventivos de quercetina sobre la disfunción endotelial.3-56.
 - Stuehr. (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **37**, 339-359.
 - Vanhoutte P. (1993). Other endothelium derived vasoactive factors *Circulation*, **87**, 9-17.
 - Velarde F. O. (2002). Enfermedades del Aparato Digestivo, Contribución Especial Fuentes Históricas de la Medicina Preshispanica, **5**, 5-8.