



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación de la actividad antioxidante y vasorrelajante
de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* karst.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA

LUZ CAROLINA ACOSTA DÁVILA



México D. F.

2013



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.

Jurado Asignado

Presidente:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal:	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
Secretario:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. suplente:	Dr. Arturo Navarro Ocaña
2do. suplente:	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E
Facultad de Química, UNAM

Asesor del tema Dr. José Fausto Rivero Cruz

Supervisor técnico _____

Sustentante Luz Carolina Acosta Dávila



CONTENIDO.

LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE CUADROS	II
LISTA DE FIGURAS Y DIAGRAMAS.....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Importancia de las enfermedades cardiovasculares en México.....	3
2.2 Plantas medicinales y su importancia.....	4
2.3. <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst.....	4
2.3.1. Generalidades.....	4
2.3.2. Distribución geográfica.	6
2.3.3. Usos y propiedades medicinales.	7
2.3.4. Estudios químicos realizados.	8
2.3.5. Hematoxilina: historia y compuestos relacionados.	11
3. JUSTIFICACIÓN.	16
4. OBJETIVOS.....	18
4.1. Objetivos Generales:	18
4.2. Objetivos Particulares:	18
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	19
5.1. Material vegetal.	19
5.2. Procedimientos generales.	20
5.2.1. Análisis cromatográficos.	20
5.2.2. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados.....	20
5.2.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.....	21



5.3. Estudio químico de <i>Haematoxylon brasiletto</i> karst.	21
5.3.1. Preparación del extracto a partir de la corteza de <i>H. brasiletto</i>	21
5.3.2. Fraccionamiento primario del extracto derivado de la corteza de <i>H. brasiletto</i>	21
5.3.3. Fraccionamiento secundario de la partición de acetato de etilo de <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst.....	22
5.3.4. Cromatografía en columna utilizando Sephadex-LH20 de la fracción activa CA-FII.....	23
5.3.5. Cromatografía en columna utilizando Sephadex-LH20 de la fracción activa CB-FV.....	24
5.3.6. Cromatografía en columna utilizando Sílica gel C18 de la fracción activa CC-FII.....	24
5.3.7. Purificación de la hematoxilina presente en la fracción activa CD-FII por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).....	25
5.4. Cuantificación del contenido de flavonoides y fenoles totales presentes en el extracto metanólico y la hematoxilina.....	27
5.4.1. Determinación de Flavonoides totales.....	27
5.4.2. Determinación de Fenoles totales.....	27
5.5. Ensayo de Blanqueamiento de β -caroteno.....	28
5.6. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto metanólico de la corteza de Palo Brasil.....	29
5.6.1. Ensayo de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	29
5.6.2. Ensayo de neutralización radical libre catiónico del 2,2-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) [ABTS ⁺].....	30
5.6.3. Medida de capacidad reductora: Ensayo FRAP.....	31
5.7. Ensayo biológico. Evaluación de la actividad vasorrelajante.....	32
5.7.1. Ensayo de aorta aislada de rata.....	32
5.7.2. Análisis de los resultados obtenidos en la evaluación farmacológica.....	33



6. RESULTADOS y DISCUSIÓN	34
6.1. Obtención de la hematoxilina a partir del extracto metanólico de la corteza de <i>H. brasiletto karst.</i>	34
6.2. Actividad antioxidante y vasorrelajante del extracto metanólico y hematoxilina obtenidos de la corteza de Palo Brasil.....	37
6.3. Comparación del efecto relajante del extracto metanólico de la corteza de <i>H. brasiletto</i> con el efecto inducido por la acetilcolina y el nitroprusiato de sodio en segmentos intactos de aorta de rata.....	40
6.4. Determinación del efecto del extracto metanólico de la corteza de <i>H. brasiletto</i> sobre segmentos de aorta de rata en ausencia de endotelio.....	41
6.5. Determinación de la activación de la vía del NO/GMPc por los compuestos bioactivos presentes en el extracto metanólico de la corteza de <i>H. brasiletto</i> empleando segmentos de aorta intacta de rata.....	42
6.6. Determinación de la participación de receptores a ACh muscarínicos en el efecto relajante producido por el extracto metanólico de la corteza de <i>H. brasiletto.</i>	44
6.7. Determinación de la activación de la vía de la PGI ₂ /AMPc por el extracto metanólico de la corteza de <i>H. brasiletto</i> empleando aorta intacta de rata.....	44
6.8. Determinación de la participación de la activación de canales de potasio en el efecto relajante producido por el extracto metanólico de la corteza de <i>H. brasiletto.</i>	45
6.9. Determinación del efecto vasorrelajante de la hematoxilina obtenida a partir del extracto metanólico de la corteza de <i>H. brasiletto</i> sobre la musculatura lisa arterial.....	47
7. CONCLUSIONES.	49
8. PERSPECTIVAS	50
9. REFERENCIAS.	51



Abreviatura	Significado
EBCh	Estación de Biología Chamela.
ECV	Enfermedades cardiovasculares.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
µg/mL	Microgramo por mililitro.
CMI	Concentración mínima inhibitoria.
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro.
mg EQ/g	Miligramos equivalentes de quercetina por gramo de muestra.
mg EAG/g	Miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra.
EAA/g	Microgramos equivalentes de ácido ascórbico por gramo de muestra.
mM	Milimolar.
µM	Micromolar.
TEAC	Milimoles equivalentes de Trolox® por gramo de muestra
Mta.	Muestra.
FRAP	Capacidad reductora de hierro.
GTFs	Glucosiltransferasas.
nm	Nanometros.
λ	Longitud de onda.
BHI	Infusión cerebro corazón.
CHX	Gluconato de clorhexidina.
µL	Microlitro.
EEP	Extracto etanólico de propóleo.
D.F.	Distrito Federal.
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar.
HCl	Ácido clorhídrico.
FeCl₃	Cloruro férrico.
AlCl₃	Tricloruro de aluminio.
Na₂CO₃	Carbonato de sodio.



Abreviaturas, cuadros, gráficos y figuras.

Na₂SO₄	Sulfato de sodio.
DPPH[·]	Radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.
ABTS⁺	Radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio.

CUADRO	CONTENIDO	PÁGINA
1	Propiedades medicinales atribuidas a <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst.	7
2	Estructuras químicas de los compuestos aislados y caracterizados de <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst	8
2 (continuación)	Estructuras químicas de los compuestos aislados y caracterizados de <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst	9
3	Algunas propiedades farmacológicas de la hematoxilina y de la brazilina.	10
4	Hematoxilina y compuestos derivados.	13
4 (continuación)	Hematoxilina y compuestos derivados.	14
5	Usos de la Hematoxilina y compuestos relacionados, a lo largo de la historia	15
6	Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatográfica de la partición en AcOEt de <i>H. brasiletto</i> Karst.	23
7	Resumen del fraccionamiento cromatográfico de la fracción CA-FII.	23
8	Resumen del fraccionamiento cromatográfico de la fracción CB-FV.	24
9	Resumen del fraccionamiento cromatográfico de la fracción CC-FII.	25
10	%AA (% Actividad Antioxidante) calculado frente a un control de H ₂ O desionizada para el ensayo de blanqueamiento de β-caroteno	29
11	Constantes espectrométricas de la Hematoxilina	35
12	Parámetros descriptivos de la capacidad antioxidante mediante los ensayos de blanqueamiento de DPPH, ABTS, FRAP, fenoles totales, flavonoides totales y blanqueamiento de β-caroteno, para el extracto total metanólico, la fracción de AcOEt y la hematoxilina.	39
13	EC ₅₀ , Emáx y potencia del efecto relajante inducido por el extracto de <i>H. brasiletto</i> , la ACh y el SNP sobre la contracción inducida por fenilefrina en segmentos de aorta intacta de rata.	41
14	EC ₅₀ , Emáx y potencia del efecto relajante inducido por el extracto de <i>H. brasiletto</i> y la hematoxilina sobre la contracción inducida por fenilefrina en segmentos de aorta intacta de rata.	48



GRÁFICO	CONTENIDO	PÁGINA
1	Curva de calibración para determinar el contenido de flavonoides totales.	27
2	Curva de calibración para determinar el contenido de fenoles totales.	28
3	Curva de calibración para determinar la capacidad de inhibición del radical DPPH [·] .	30
4	Curva de calibración para determinar la capacidad de atrapamiento del radical ABTS ^{·+} .	31
5	Curva de calibración para la determinación de la capacidad reductora de hierro.	32

FIGURA	CONTENIDO	PAGINA
1	<i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst. A la izquierda se observan las hojas en forma de moños, divididas en hojuelas de seis y las flores amarillas de tamaño ligeramente desigual. A la derecha se observa la corteza que va de café a rojo claro.	5
2	<i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst. A la izquierda se muestra el árbol completo y a la derecha ramas con espinas duras de 1 a 3 cm de largo.	6
3	Distribución geográfica de <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst en la República Mexicana.	6
4	Ubicación geográfica de la EBCh.	19
5	En la parte superior (A) se muestra el espectro de RMN- ¹ H, mientras que en la parte inferior (B) se muestra el espectro de RMN- ¹³ C de la hematxilina.	36
6	Cromatograma obtenido por medio de CLAE de la hematxilina a dos longitudes de onda ($\lambda= 254$ nm y $\lambda= 285$ nm), mostrando un tiempo de retención de 2.945 min.	37
7	Efecto del extracto metanólico de la corteza de la especie vegetal <i>Haematoxylon brasiletto</i> (Leguminosae) sobre el tono del músculo liso vascular	40
8	Comparación de las curvas concentración-respuesta del efecto relajante del SNP, la ACh y el extracto de <i>H. brasiletto</i> en segmentos de aorta intacta de rata.	41
9	Curvas concentración-respuesta del efecto vasorrelajante producido por el extracto metanólico de la corteza de <i>H. brasiletto</i> en anillos de aorta intacta y en ausencia de endotelio.	42
10	Curvas concentración- respuesta del efecto vasorrelajante producido por el extracto metanólico de la corteza de <i>H. brasiletto</i> sobre la contracción inducida	43



Abreviaturas, cuadros, gráficos y figuras.

	por fenilefrina en anillos de aorta en presencia y en ausencia de A. L-NAME ó B. ODQ.	
11	Curvas concentración-respuesta del efecto relajante producido por el extracto metanólico de la corteza de <i>H. brasiletto</i> sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta en presencia y en ausencia de atropina.	44
12	Curvas concentración-respuesta del efecto relajante producido por el extracto metanólico de la corteza de <i>H. brasiletto</i> sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta en presencia y en ausencia de indometacina.	45
13	Curvas concentración-respuesta del efecto relajante producido por el extracto metanólico de la corteza de <i>H. brasiletto</i> sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta en presencia y en ausencia de TEA.	46
14	Estructura química de la hematoxilina obtenida del extracto metanólico de <i>H. brasiletto</i> .	47
15	Curvas concentración-respuesta del efecto relajante producido por el extracto metanólico de la corteza de <i>H. brasiletto</i> y la hematoxilina, su compuesto mayoritario, sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta	48



1. INTRODUCCIÓN

Es evidente que gran parte del esplendor de las culturas antiguas está relacionada con el conocimiento que éstas poseían acerca del uso, propiedades y cualidades de una gran variedad de especies vegetales estableciéndose con ello, una estrecha relación entre la diversidad cultural y la diversidad biológica. El uso de plantas con fines curativos se remonta al principio de la historia y particularmente en nuestro país se describe desde la época prehispánica.

En nuestro país existen unas 26 mil variedades de plantas, el 10.4% de estas crecen en el planeta, y al menos 5% de especies mexicanas han sido investigadas desde un punto de vista químico. En base a lo dicho anteriormente y considerando que las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en México, en este trabajo se realizó el estudio químico-farmacológico del extracto metanólico de la especie vegetal *Haematoxylon brasiletto karst.* (Leguminosae) y se investigó acerca de su propiedad antioxidante. Según un estudio etnomédico, la corteza de *H. brasiletto* preparada como té se emplea de manera tradicional para tratar entre otras enfermedades la hipertensión arterial. Los resultados de la evaluación farmacológica mostraron que el extracto de esta planta contiene compuestos que relajan la musculatura lisa arterial de una manera dependiente de la concentración.

Adicionalmente, se inició el estudio fitoquímico del extracto, el cual resultó en el aislamiento de la hematoxilina. Este compuesto se ha reportado como un homoisoflavonoide presentando importantes propiedades farmacológicas entre las cuales podemos destacar las propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, vasorrelajantes, anticonvulsivas y antioxidantes. (Pratt y Yuziriha, 1959; Rivero-Cruz, 2008)

Dentro del grupo de los antioxidantes se encuentran los flavonoides, que son compuestos de gran importancia en el campo cardiovascular, se ha demostrado



que hay una asociación inversa entre la ingesta diaria de flavonoides y la mortalidad a causa de una enfermedad coronaria. Este efecto cardioprotector podría explicarse por la combinación de propiedades antioxidantes, antiagregantes plaquetarios y vasodilatadores (Carroll *et al.*, 1998; Ko *et al.*, 1991; Duarte *et al.*, 2001). Recientemente se ha reportado que ejercen efectos antihipertensivos y reducen la hipertrofia del ventrículo izquierdo, la disfunción endotelial y mejoran el estatus oxidativo, plasmático y hepático (Duarte *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2002).

La Hematoxilina presentó un efecto vasorrelajante similar al observado por el extracto completo, lo cual sugirió que la hematoxilina podría ser el compuesto más importante responsable de la actividad relajante observada. Finalmente, un estudio farmacológico más detallado indicó que el mecanismo empleado por los compuestos vasorrelajantes involucra dos mecanismos diferentes: uno dependiente de endotelio, que involucra la activación de la vía del NO/GMPc y otro independiente de endotelio que involucra la activación de canales de K⁺ activados por Ca²⁺. Estos resultados preliminares indican que *H. brasiletto* contiene compuestos que ejercen su efecto vasodilatador mediante diferentes mecanismos de acción.

Los resultados derivados de la presente investigación permitieron por una parte, validar científicamente el uso de *H. brasiletto* en la medicina tradicional mexicana y por otra parte, obtener la hematoxilina, un compuesto vasorrelajante conocido, cuyo efecto farmacológico y mecanismo de acción no había sido descrito. Se espera que los compuestos aislados de *H. brasiletto* puedan constituir prototipos estructurales para el desarrollo de fármacos útiles para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.



2. ANTECEDENTES.

2.1 Importancia de las enfermedades cardiovasculares en México.

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) constituyen la principal causa de muerte en el continente americano y son una causa común de discapacidad, muerte prematura y gastos excesivos para su prevención y control.

Una de las ECVs más importantes es hipertensión arterial sistémica (HTAS). Se estima que existen en el mundo 600 millones de personas que padecen HTAS, de éstos, 420 (70%) millones corresponden a países en vías de desarrollo. Este padecimiento es uno de los principales factores de riesgo para enfermedad arterial coronaria y accidente vascular cerebral. En México aproximadamente 15.2 millones de personas tienen HTAS y se calcula que aproximadamente el 1.5% de todos los hipertensos mueren cada año por causas directamente relacionadas con esta enfermedad. En la Encuesta nacional de Salud (ENSA) 2000 se definió a un paciente como portador de hipertensión arterial si presenta cifras de > 140 mmHg para la presión arterial sistólica y/o > 90 mmHg para presión arterial diastólica. Los resultados obtenidos en esta encuesta alertan sobre la necesidad de intensificar las estrategias para la detección, control, tratamiento y prevención de la HTAS en México (Velázquez-Monroy *et al.*, 2003).

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), durante los próximos diez años se estima que ocurrirán aproximadamente 20.7 millones de defunciones por enfermedades cardiovasculares en América, de las cuales 2.4 pueden ser atribuidas a la hipertensión arterial. Cada año mueren alrededor de 17 millones de personas en el mundo por enfermedades cardiovasculares y se estima que cada cuatro segundos ocurre un evento coronario y cada cinco segundos un evento vascular cerebral. Aproximadamente entre 1.5 y 5 % de todos los hipertensos mueren cada año por causas directamente relacionadas a la hipertensión arterial sistémica. La prevalencia de HTA se incrementa con la edad, no obstante, a partir



de los 60 años: más del 50% de los hombres y casi el 60% de las mujeres presentan hipertensión arterial. (Córdova y Hernández, 2008).

2.2 Plantas medicinales y su importancia.

En México, las plantas medicinales son el recurso material más amplio y valioso de la Medicina Tradicional. Su estudio es un tema recurrente en su historia, tarea muy compleja si se piensa en la enorme riqueza cultural y florística del país. Es tercero en el mundo en biodiversidad y segundo en el hemisferio occidental en lenguas y culturas distintas (Argueta *et al.*, 1994).

Las plantas medicinales contienen principios activos, que si bien son los responsables de las propiedades terapéuticas que se les atribuyen, también son de las intoxicaciones y reacciones adversas que pueden aparecer si se emplean en dosis inadecuadas o por periodos prolongados. La falta de información objetiva y actualizada sobre los riesgos y beneficios que puede provocar el uso de plantas medicinales, es una de las causas principales de que la población las use de manera indiscriminada, argumentando que son inocuas y más seguras, por el simple hecho de ser naturales (Pacheco y González, 2006).

Por otra parte los productos naturales constituyen una fuente muy valiosa en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas. Un elevado porcentaje de los medicamentos que se utilizan actualmente contienen principios activos de origen natural, principalmente vegetal. Así mismo, un gran número de sustancias naturales han representado prototipos estructurales para la síntesis de fármacos análogos con mayor actividad biológica (Cordell, 2000).

2.3 *Haematoxylon brasiletto* Karst.

2.3.1 Generalidades

Haematoxylon brasiletto Karst (Leguminosae) es un árbol de 7 a 15 metros de altura, cuyas ramas tienen espinas duras de 1 a 3 cm de largo; su corteza va del café claro a rojizo, mientras que el centro del tallo va del café muy oscuro al rojo intenso. Las hojas, con forma de moños, se encuentran divididas en seis hojuelas.



Tiene racimos de flores amarillas, ligeramente desiguales en tamaño; y los frutos son legumbres aplanadas más largas que anchas y no abren al madurar; sus semillas son alargadas (Argueta *et al.*, 1994).

El árbol florece de febrero a marzo, es de origen nativo y se propaga por medio de semilla; cabe mencionar que éste, representa una abundante fuente productora de néctar y polen. Con su madera se produce carbón; así mismo proporciona un tinte semejante pero no igual al de palo de tinta (*Haematoxylon campechianum*). Antiguamente se utilizaba como colorante natural, para fabricar postes y en la construcción de casas, así como horcones y morillos.

Es conocido popularmente con los nombres de “azulillo”, “corteza de Brasil”, “palo Brasil”, “palo de tinta” y “palo tinto”, “guichachaco”, “yowi”, “kakoameé”, entre otros (Argueta *et al.*, 1994).



Figura 1. *Haematoxylon brasiletto* Karst. A la izquierda se observan las hojas en forma de moños, divididas en hojuelas de seis y las flores amarillas de tamaño ligeramente desigual. A la derecha se observa la corteza que va de café a rojo claro.



Figura 2. *Haematoxylon brasiletto* Karst. A la izquierda se muestra el árbol completo y a la derecha ramas con espinas duras de 1 a 3 cm de largo.

2.3.2 Distribución geográfica.

El palo Brasil es un árbol originario del norte de Granada, que habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado. Está asociado a bosques tropicales, caducifolio y subcaducifolio, matorral xerófilo, así como a bosques espinosos, mesófilo de montaña, de encino y de pino (Argueta *et al.*, 1994), principalmente en depresión central en donde forma comunidades densas de Brasil.

En México, esta especie se distribuye principalmente en los Estados de Baja California Sur, Sonora, Morelos, Nayarit, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Guanajuato y en el Estado de México (Argueta *et al.*, 1994).



Figura 3. Distribución geográfica de *Haematoxylon brasiletto* Karst en la República Mexicana.



2.3.3. Usos y propiedades medicinales.

Desde épocas prehispánicas, esta especie ha sido utilizada por sus diversas propiedades y/o usos medicinales, tales como: padecimientos renales, problemas cardiovasculares, antidiabéticos, antisépticos, antipirético, control de la ictericia, así como por propiedades antimicrobianas, por tan solo citar algunos.

Cabe mencionar que para el tratamiento de tales padecimientos, se utilizan diversas partes de dicha especie, ya sea en forma de infusiones o en forma de tinturas; las cuales se muestran el **Cuadro 1**.

Asimismo *H. brasiletto* se emplea en la fabricación de cremas y geles, para teñir el cabello, además de ser utilizado como colorante en la industria textil (Paris y Rousselet, 1958; Lolor y Martín, 1959).

Cuadro 1. Propiedades medicinales atribuidas a *Haematoxylon brasiletto* Karst. (Argueta *et al.*, 1994).

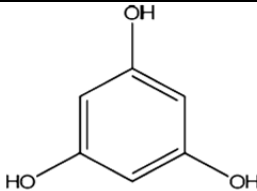
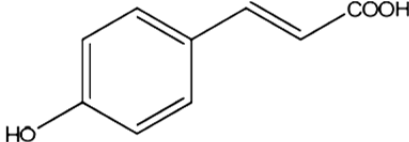
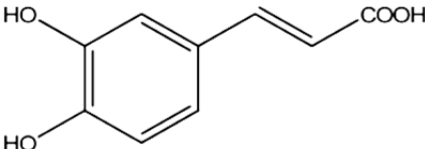
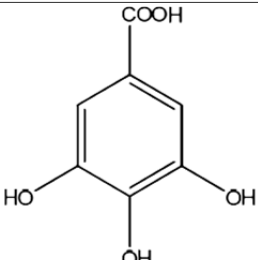
Uso popular	Parte de de la planta utilizada	Vía de administración.
Padecimientos renales	Corteza y tronco	Oral
Padecimientos cardiovasculares	Corteza y tallo	Oral
Antidiabético	Toda la planta	Oral
Antidiarreico	Corteza y tronco	Oral
Antiséptico	Corteza y tronco	Oral
Dolor de espalda	Flores	Oral y tópico
Dolor de pulmón	Raíz y hojas	Oral y tópico
Enfermedades gastrointestinales	Corteza y tallo	Oral
Dolor corporal	Toda la planta	Oral o tópico
Antiinflamatorio	Corteza, flores y hojas	Oral
Padecimientos biliares	Corteza y tronco	Oral
Dolor de bazo	Corteza y tallo	Oral y tópico
Dolor de dientes	Corteza y tallo	Oral
Control de la ictericia	Toda la planta	Oral
Antianémico	Flores	Oral
Antipirético	Toda la planta	Oral
colorante	Corteza y tallo	



2.3.4. Estudios químicos realizados.

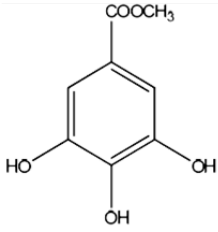
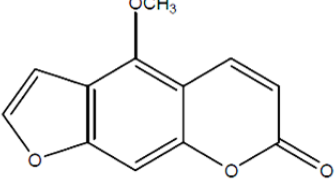
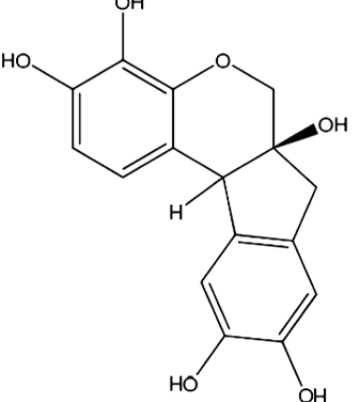
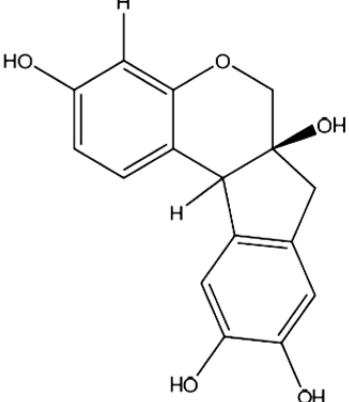
Estudios químicos previos de *H. brasiletto* Karst han permitido la purificación y caracterización de ocho compuestos aromáticos (Pratt y Yuziriha, 1959; Rivero-Cruz, 2008) cuyas estructuras se muestran en el **Cuadro 2**. Los homoisoflavonoides hematoxilina y brazilina presentan importantes propiedades farmacológicas (**Cuadro 2**) entre las cuales podemos destacar las propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, vasorrelajantes, anticonvulsivas y antioxidantes.

Cuadro 2. Estructuras químicas de los compuestos aislados y caracterizados de *Haematoxylon brasiletto* Karst.

Compuesto	Estructura	Referencia
Floroglucinol		Rivero Cruz, 2008
Ácido 4-hidroxicinámico		Rivero Cruz, 2008
Ácido cafeico		Rivero Cruz, 2008
Ácido gálico		Rivero Cruz, 2008



Cuadro 2 (continuación). Estructuras químicas de los compuestos aislados y caracterizados de *Haematoxylon brasiletto* Karst.

Galato de metilo		Rivero Cruz, 2008
5-metoxisoraleno		Rivero Cruz, 2008
Hematoxilina		Pratt y Yuziriha, 1959
Brazilina		Pratt y Yuziriha, 1959



Cuadro 3. Algunas propiedades farmacológicas de la Hematoxilina y de la Brazilina.

Propiedad farmacológica	Hematoxilina	Brazilina	Referencia
Antiinflamatoria	+	+	Hikino <i>et al.</i> ,1997
Inhiben de manera independiente las concentraciones inducidas de KCl y CaCl₂ en aorta de rata	+	+	Xie <i>et al.</i> ,2000
Aséptica	+	+	Takechi y tanaka, 1982
Disminuye los niveles de glucosa en ratones diabéticos		+	Moon <i>et al</i> 1985 y 1993; Kim <i>et al.</i> ,1998
Inhibidor competitivo de ATP en c- Scr	+		Li Gen <i>et al.</i> , 2008
Antimicrobiana	+	+	Beak <i>etal.</i> , 2000; Martinez, 2001; Punsrirat, 2007.
Antihipertensivo	+	+	Punsrirat, 2007.
Antioxidante	+	+	Punsrirat, 2007.
Anticonvulsiva	+	+	Punsrirat, 2007.
Incrementa los niveles de IgM (posible utilidad para enfermedades autoinmunes)		+	Choi <i>et al.</i> , 1997
Inhibidor de las proteínas tirosina cinasa PTKs particularmente de c-Scr tirosina cinasa	+		Li Gen <i>et al.</i> , 2008
Bloquea la fosforilación de tirosina cinasa	+		Li Gen <i>et al.</i> , 2008
Agente vasorrelajante	+	+	Yi-Wu <i>et al.</i> ,2000
Biosensor	+		Nazirizadeh <i>et al.</i> , 2009
Utilizado en la tinción de mielina	+		Kutscher <i>et al.</i> , 1987
Utilizado como colorante en tinciones histológicas	+		Waldeyer, 1985; Tifford, 2005
Colorante de telas (seda,algodón y lino)	+		Slightly y Fred 1868; Cardon,2007



2.3.5. Hematoxilina: historia y compuestos relacionados.

La hematoxilina era obtenida inicialmente a partir del palo de Campeche (*Haematoxylon campechianum*), árbol que crece en América Central y el Caribe.

Al arribo de los europeos en busca de oro y plata a la Península de Yucatán a fines del siglo XV, se encontraron con el uso del palo tinto, llamado por los habitantes Mayas “**ek**”, que era utilizado para teñir algodón, así como para fines medicinales. Aún cuando inicialmente no fue reconocido su inmenso valor, esta densa madera, llamada en esa época “*Bois de Campeche*” y “logwood” por los ingleses, era utilizado como lastre para los barcos que regresaban a Europa. Una vez que la utilidad de “logwood” se hizo evidente, cantidades cada vez mayores fueron enviadas a Europa (Cooksey, 2009).

Sin embargo, en Inglaterra, una ley del Parlamento en 1581 prohibió el uso de palo tinto como colorante, alegando que era “falso y fraudulento” y que “sólo se vendió y lanzó para engañar a la realeza y a las Reinas dentro de su reino en Inglaterra y en las colonias para el gran descredito y difamación tanto de los comerciantes como de los tintoreros del reino”. La verdadera razón era proteger la producción del glasto (*Isatis tinctoria*). El decreto fue derogado en Inglaterra en 1662, sin embargo, en otros países europeos la prohibición permaneció por al menos otros cien años.

Una vez que la alquimia evolucionó hacia la química moderna a finales del siglo 18, muchas investigaciones se realizaron a las plantas, particularmente en Francia. Un logro notable fue el desarrollo de técnicas para el aislamiento y la cristalización de sustancias. Los precursores tintóreos de la madera brazilina y hematoxilina fueron descubiertos durante este período (1810-1812). Aún cuando la fórmula molecular de ambos compuestos fue determinada, las estructuras moleculares no fueron elucidadas hasta el siglo XX (Cooksey, 2009). Tan pronto como la popularidad del árbol denominado “logwood” se incrementó para utilizarlo



como colorante, las cantidades colectadas se incrementaron dramáticamente de 1000 ton/año en 1690 a miles de ton/año en el siglo XIX, teniendo el pico de producción en 100,000 ton/año en 1896. Durante el siglo XX su popularidad decreció y solo hubo un repunte durante las Guerras Mundiales (Cooksey, 2009; Smith, 2006). De tal forma que la utilización de la hematoxilina en los laboratorios de histología y de citología, es el resultado de siglos de guerra, conflictos, y descubrimiento (Cooksey, 2009; Smith, 2006).

Las razones mencionadas dieron pie a continuar con las investigaciones acerca de la hematoxilina, descubriendo así algunos productos derivados de la oxidación de ésta, uno de ellos es la hemateína. Ambos compuestos, son los principales antibacterianos y colorantes de la especie *Haematoxylon brasiletto* Karst, además de la brazilina (Lalor *et al.*, 1959; 1962; Craig *et al.*, 1965).

Algunos de estos compuestos, derivados de la oxidación de la hematoxilina, así como otros obtenidos a través de síntesis parciales de ésta o derivados se muestran en el **Cuadro 4**.

Por otra parte, la hematoxilina y sus derivados han sido de gran utilidad a lo largo de la historia (**Cuadro 5**), en las tinciones biológicas y por sus actividades antimicrobianas, antihipertensivas, antiinflamatorias, antioxidantes y anticonvulsivantes (Cooksey, 2009; Smith, 2006).

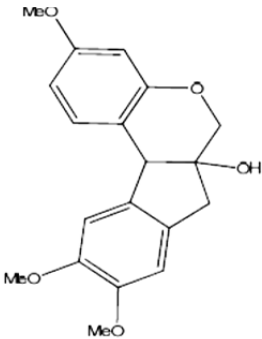
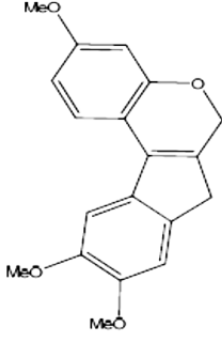
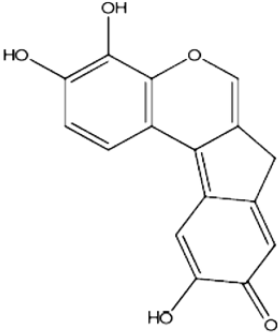
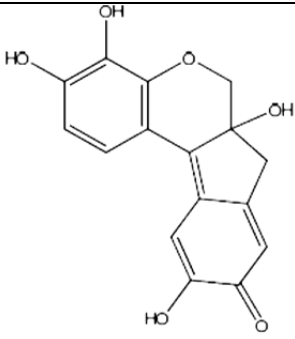


Cuadro 4. Hematoxilina y compuestos derivados

Compuesto	Estructura	Referencia
Hematoxilina		Pratt y Yuziriha, 1959
Brazilina		Mićović y Robinson 1937.
Hidroxihematoxilina		Lalor y Martin, 1959; Lalor, 1962.
O-dietilenhematoxilina		Morshing y Robinson, 1970



Cuadro 4. (Continuación) Hematoxilina y compuestos derivados.

Compuesto	Estructura	Referencia
O-trimetilbrazilina		Perkin <i>et al.</i> 1928
Deoxitrimetilbrazilina		Perkin <i>et al.</i> 1928
Isohemateína		Mićović y Robinson, 1937
Hemateína		Havas, (1986)



Cuadro 5. Usos de la Hematoxilina y compuestos relacionados, a lo largo de la historia.

Compuesto	Época	Uso	Referencia
Palo tinto	Finales del siglo XV	Mayas: para teñir algodón y para usos medicinales. Europeos: lastre para los barcos y posteriormente como colorante	Davies, 2008
Hematoxilina y palo tinto	Siglo XVI y XVII	Utilizados por los Mayas y los Aztecas, para una variedad de colores pastel. En Francia, E.U.A. y América del sur, se utilizaba para teñir: cuero, seda y papel.	Schweppe, 1993
Hematoxilina y hemateína	1864	Utilizado en tinciones en histología y citología.	Conn, 1925
Hematoxilina	1943	Utilizado para teñir cuero, lino y algodón	Cardon, 2007
Brazilina y hematoxilina	2007	Antimicrobiano, antihipertensivo, antiinflamatorio, antioxidante, anticonvulsivante.	Punsrirat, 2007



3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad las ECV son la principal causa de muerte a nivel mundial según la OMS, afectan por igual a ambos sexos, y más del 80% se producen en países de ingresos bajos y medios. Se calcula que en 2030 morirán cerca de 25 millones de personas por ECV, y se prevé que sigan siendo la principal causa de muerte.

La modificación de los factores de riesgo puede reducir los episodios cardiovasculares y la muerte prematura tanto en las personas con enfermedad cardiovascular establecida como en aquellas con alto riesgo cardiovascular debido a uno o más factores de riesgo. Los principales factores de riesgo son una dieta malsana, la inactividad física, el consumo de tabaco y el consumo nocivo de alcohol.

En nuestro país en particular no hay una cultura de prevención para este tipo de padecimientos, ya que aun habiendo campañas contra la obesidad, estas no sirven de mucho si no se inculca desde pequeños una alimentación sana, actividades físicas, y bajo consumo en sustancias de abuso.

Por lo antes mencionado se ha intensificado la búsqueda de diferentes alternativas a los tratamientos ya existentes, debido a los efectos adversos que presentan algunos de ellos, una de estas alternativas es el empleo de productos derivados de plantas. En este sentido los productos derivados de la especie *Haematoxylon brasiletto* tiene gran relevancia en la medicina tradicional en el tratamiento de diversos padecimientos debido a sus múltiples actividades biológicas.

Con base en los antecedentes descritos previamente, este proyecto de investigación se enfocó en determinar la actividad vasorrelajante y antioxidante del extracto metanólico derivado de *Haematoxylon brasiletto* recolectado en la Estación de Biología Chamela (EBCh), dependencia del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México localizada en el Estado de Jalisco y del compuesto mayoritario hematoxilina. Los posibles hallazgos, en conjunto con la



gran diversidad de plantas en México, prácticamente inexploradas como fuentes de compuestos activos, constituyen un punto de partida valioso para el descubrimiento de compuestos con actividad vasorrelajante.

4. OBJETIVOS.

4.1 Generales.

El objetivo general del presente proyecto de investigación consiste en evaluar la actividad vasorrelajante y antioxidante del extracto metanólico de la corteza de *Haematoxylon brasiletto karst* recolectada en la Estación de Biología Chamela (EBCh), dependencia del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México localizada en el Estado de Jalisco.

4.2 Particulares.

- Preparar el extracto metanólico a partir de la muestra recolectada en la Estación de Biología Chamela (EBCh).
- Aislar en forma pura la hematoxilina.
- Determinar el efecto farmacológico de la hematoxilina sobre el tono del músculo liso vascular de la aorta aislada de rata, intacta y sin endotelio.
- Determinar la potencia y la eficacia del efecto farmacológico presentado por la hematoxilina, mediante la comparación de su concentración efectiva media (CE_{50}) y su efecto máximo ($E_{máx}$) con los parámetros presentados por compuestos control (nitroprusiato de sodio y acetilcolina).
- Realizar la caracterización farmacológica preliminar del efecto vasodilatador producido por la hematoxilina con la finalidad de proponer su posible mecanismo de acción.



5. PARTE EXPERIMENTAL.

5.1. Material vegetal.

La especie *Haematoxylon brasiletto* karts fue recolectada en la fecha de 28 de julio del año 2012, en la Estación de Biología Chamela (EBCh) una dependencia del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México localizada en el Estado de Jalisco, fue colectada e identificada por la Dra. María Graciela García Guzmán y la Biól. Irma Acosta Calixto del Instituto de Ecología, UNAM.

La Estación cuenta con un total de 3,319 Ha. de terreno, cubiertas principalmente por bosque tropical caducifolio. La topografía de la EBCh presenta lomeríos bajos y pequeñas cañadas, que confluyen en arroyos. La mayor parte del terreno tiene una altitud que no sobrepasa los 150 m, pero el rango es de 10 m a 580 m. No hay corrientes de agua permanente. Las pendientes de las laderas son en su mayoría de 21 a 34°, existe un cerro con acantilados y áreas con mesetas. Los suelos son arenosos y de profundidad muy variable, con pH cercano a 7. En los lomeríos es poca la materia orgánica y el fósforo disponible es escaso.

El clima de Chamela es tropical, cálido subhúmedo, con una marcada estacionalidad. La sequía se presenta de noviembre a junio, algunas veces interrumpida por lluvias ligeras o fuertes en diciembre o enero. El promedio de días con lluvia apreciable es de 52, con más o menos 5 lluvias fuertes. Los ciclones pasan paralelos a la costa. La temperatura promedio anual es de 24.6°C y la máxima promedio es de 30.3°C.



FIGURA 4. Ubicación geográfica de la EBCh.

5.2. Procedimientos generales de análisis.

5.2.1. Análisis cromatográficos.

La cromatografía por adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice Kiesegel 60 Merck con tamaño de partícula 0.063-0.200mm, 70-230 mesh ASTM, Sephadex LH-20 (Fluka) y C₁₈ Bakerbond (40 µm, Baker). Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) de tipo analítica o preparativa se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio y/o de vidrio de diversas dimensiones, las cuales están recubiertas con gel de sílice (60F254 Merck®, tamaño de partícula 0.063-0.200mm, 70-230 mesh ASTM] de 0.25 mm de espesor. Las placas fueron reveladas con tricloruro de hierro al 5%, vainillina sulfúrica y vainillina en HCl seguido de calentamiento (aproximadamente 110°C) hasta la visualización completa. Cabe destacar que antes de ser reveladas, dichas placas fueron visualizadas a dos longitudes de onda (254 y 365 nm).

5.2.2. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados.

La determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (EM/IE) se determinaron en un Thermo Electron DFS (Double Focus Sector) introducción directa a 70 eV y bombardeo de átomos rápidos (EMFAB).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-¹H) y de carbono 13 (RMN-¹³C) se generaron en un equipo marca Varian, modelo VNMRS el cual se operó a una radiofrecuencia de 400 y 100 MHz, respectivamente. Los

espectros se realizaron utilizando CD₃OD y los desplazamientos químicos se reportan en ppm referidas al tetrametilsilano (TMS).

5.2.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo Shimadzu modelo 10 A VP equipado con un detector de UV dual. El control del equipo, la adquisición de los datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa de software LC solution versión 1.22 SP1. La separación y la purificación de los compuestos se efectuó empleando una columna de sílica gel C-18 (Waters, X-Bridge, 5µm OBD, 19 × 50 mm). La detección se ajustó a 254 nm.

5.3. Estudio químico de *Haematoxylon brasiletto* Karst.

5.3.1. Preparación del extracto a partir de la corteza de *H. brasiletto*.

La corteza seca y molida (182.9 g corteza) se sometió a un proceso de maceración utilizando metanol (2.0 L) como disolvente durante 48 horas. Después se filtró, el extracto se secó a presión reducida y se obtuvieron 112 g de un sólido rojo oscuro.

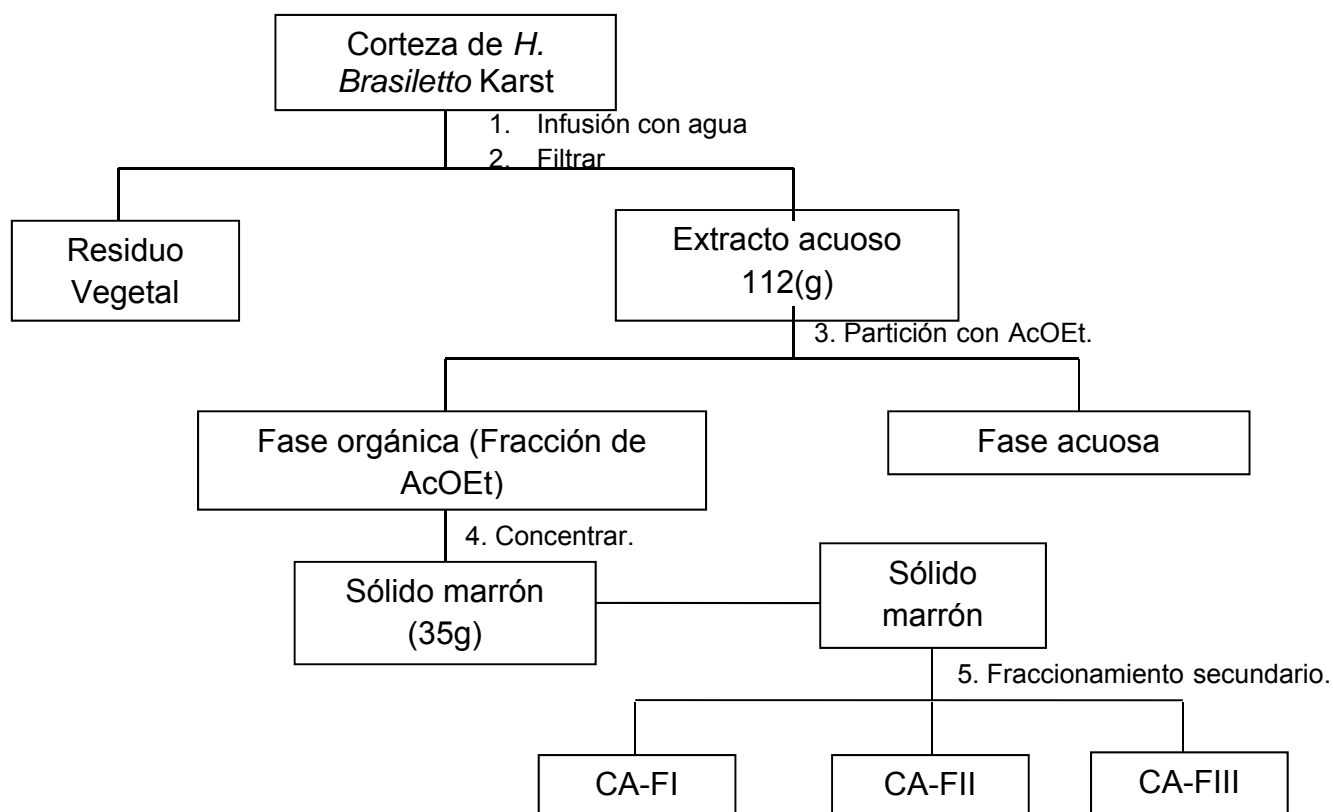
5.3.2. Fraccionamiento primario del extracto derivado de la corteza de *H. brasiletto*.

El extracto se sometió a un proceso de fraccionamiento primario utilizando un método de partición y como disolventes agua y acetato de etilo. La fase orgánica (AcOEt) se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida, obteniendo 35 g de un sólido amorfo de color naranja-marrón.

5.3.3. Fraccionamiento secundario de la partición de acetato de etilo de *Haematoxylon brasiletto* Karst.

Una porción de 1.24 g de la fracción de AcOEt derivada de la partición del extracto de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* Karst se sometió a un proceso de cromatografía en columna abierta (24 × 5 cm) utilizando Sephadex LH-20 como adsorbente y MeOH como fase móvil. Se colectaron 24 eluatos de 50 mL cada uno, los cuales se agruparon de acuerdo a su similitud cromatográfica en tres fracciones combinadas (CA-FI – CA-FIII). El **Diagrama 1** resume el proceso de fraccionamiento del extracto acuoso obtenido a partir de la corteza de *H. brasiletto* Karst, mientras que el **Cuadro 6** muestra el fraccionamiento primario del extracto acuoso.

Diagrama 1. Procedimiento del fraccionamiento primario y secundario del extracto acuoso obtenido a partir de la corteza de *H. brasiletto* Karst.



Cuadro 6. Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatográfica de la fracción de AcOEt de *H. brasiletto* Karst.

Fase móvil	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave	Peso (mg)
MeOH	1-24	1-3	CA-FI	47.1
		4-14	CA-FII	1277
		15-24	CA-FIII	155.6

5.3.4. Cromatografía en columna utilizando Sephadex-LH20 de la fracción activa CA-FII.

Posteriormente, se realizó la cromatografía en columna de la fracción CA-FII, utilizando Sephadex LH-20 (24 × 5 cm) como adsorbente y MeOH como fase móvil. Se recolectaron 20 fracciones de 50 mL. Las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina y se reunieron aquellas que resultaron ser similares, generándose así 6 fracciones terciarias (CB-FI a CB-FVI). En el **Cuadro 7** se resume el proceso cromatográfico.

Cuadro 7. Resumen del fraccionamiento cromatográfico de la fracción CA-FII.

Fase móvil	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave	Peso (mg)
MeOH	1-2	1-3	CB-FI	23.9
		4-7	CB-FII	44.8
		8	CB-FIII	11.6
		9	CB-FIV	54.5
		10-17	CB-FV	499.5
		18-20	CB-FVI	432.0

5.3.5. Cromatografía en columna utilizando Sephadex-LH20 de la fracción activa CB-FV.

La fracción CB-FV se sometió a una cromatografía en columna, utilizando Sephadex LH-20 (24 × 5 cm) como adsorbente y MeOH como fase móvil. Se recolectaron 25 fracciones de 50 mL, las cuales fueron analizadas por cromatografía en capa fina, reuniendo aquellas de naturaleza semejante, resultando 3 fracciones (CC-FI a CC-FIII), tales se muestran en el **Cuadro 8**.

Cuadro 8. Resumen del fraccionamiento cromatográfico de la fracción CB-FV.

Fase móvil	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave	Peso (mg)
MeOH	1-25	1-4	CC-FI	14.6
		5-7	CC-FII	262.8
		8-25	CC-FIII	202.1

5.3.6 Cromatografía en columna utilizando Sílica gel C₁₈ de la fracción activa CC- FII.

La fracción CC-FII, fue sometida a una columna de vidrio, utilizando C18 como adsorbente, y como fase móvil, MeOH-H₂O (1:1). Se recolectaron 27 fracciones de 50 mL, las cuales, fueron analizadas por cromatografía en capa fina, reuniendo aquellas que resultaron ser semejantes, obteniéndose nueve fracciones totales (CD-FI a CD-FIX), las cuales se resumen en el **Cuadro 9**.

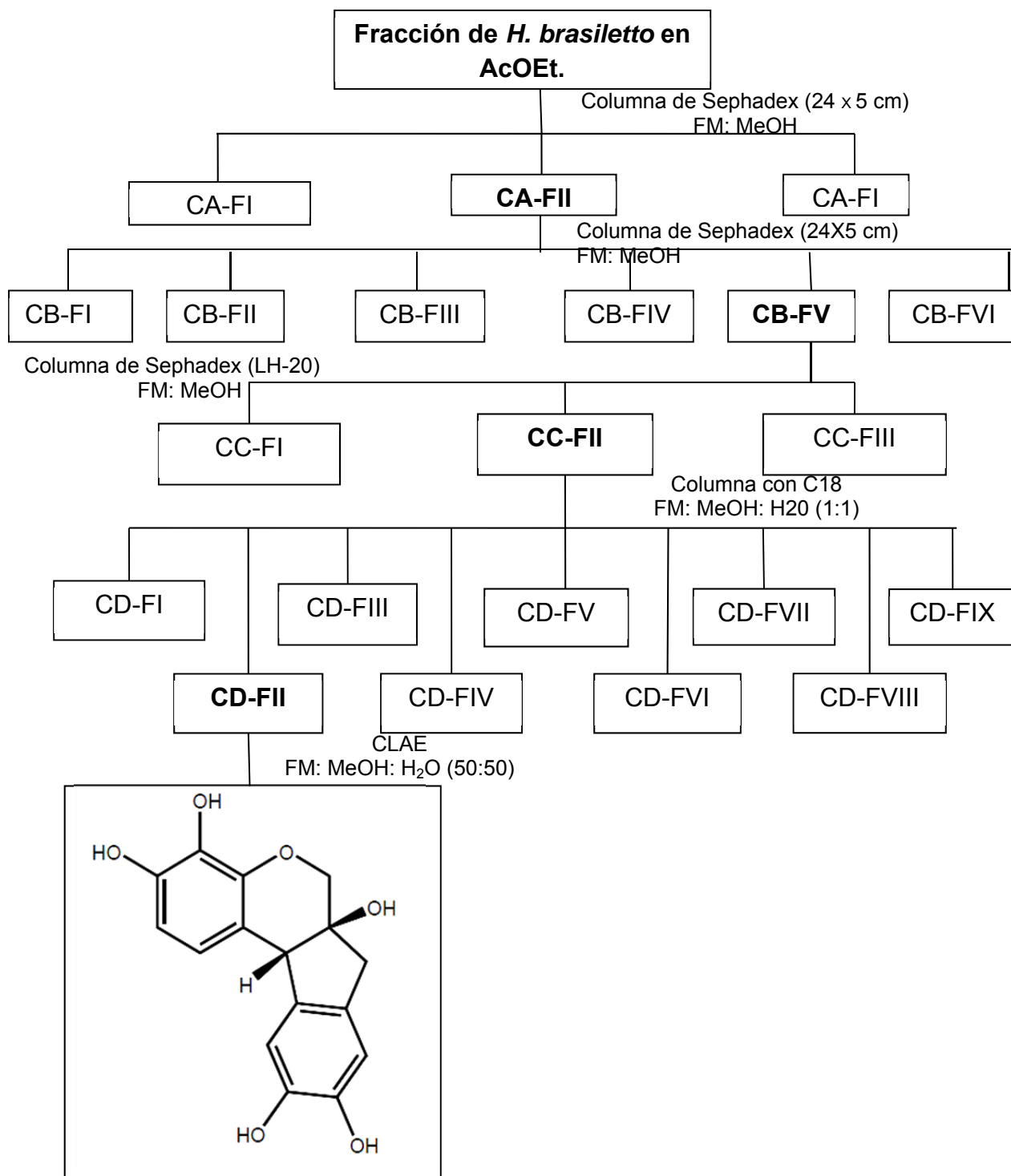
Cuadro 9. Resumen del fraccionamiento cromatográfico de la fracción CC-FII.

Fase móvil	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave	Peso (mg)
MeOH: H ₂ O	1:1	1-27	1-3	CD-FI	5.7
			4-7	CD-FII	9.7
			8-11	CD-FIII	28.4
			12-16	CD-FIV	64.6
			17-19	CD-FV	60.8
			20	CD-FVI	7.9
			21-27	CD-FVII	34
				CD-FVIII	36.5
MeOH	100	28-31	28-31	CD-FIX	11.2

5.3.7. Purificación de la hematoxilina presente en la fracción activa CD-FII por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).

La resolución mediante CLAE de la fracción CD-FII se realizó en una columna de fase reversa de C₁₈ utilizando un flujo 3 mL/min y como fase móvil una mezcla binaria constituida por metanol-agua, en proporción 50:50.

Diagrama 2. Fraccionamiento de la partición de *H. brasiletto* en AcOEt

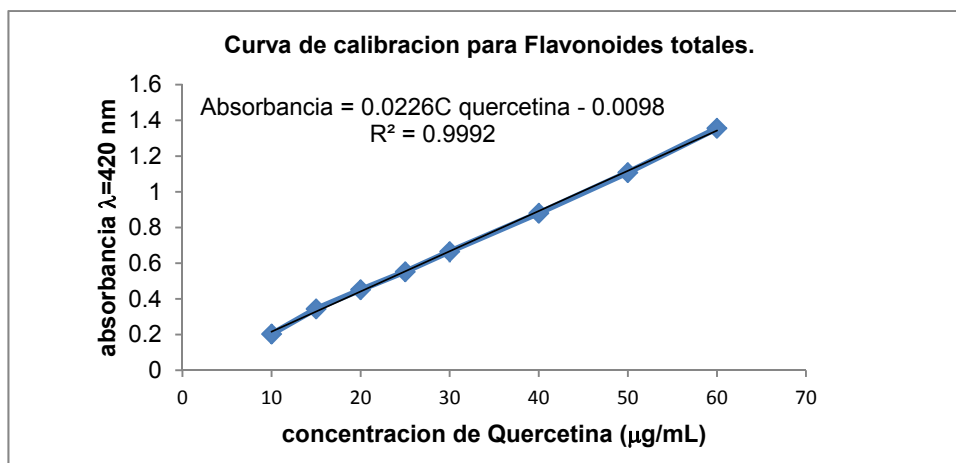


5.4 Cuantificación del contenido de flavonoides y fenoles totales presentes en el extracto metanólico y la hematoxilina.

5.4.1. Determinación de Flavonoides Totales

La determinación de flavonoides totales se realizó en placas de 96 pozos, siguiendo la metodología de Kumazawa y colaboradores (2004). Se adicionaron 100 μL de solución de la muestra (1 mg/mL), y 100 μL de solución etanólica de AlCl_3 al 2%. Se dejó incubar a temperatura ambiente una hora y se midió la absorbancia a 415 nm en un lector de placas ELISA BIO•RAD Benchmark. Cada muestra se realizó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones \pm la desviación estándar correspondiente.

En la Gráfica 1, se muestra la curva de calibración de quercetina que se construyó en un intervalo de concentración entre 10-60 $\mu\text{g/mL}$, con el fin de expresar los resultados como equivalentes de quercetina por gramo de muestra ($\mu\text{g}_{\text{quercetina}}/\text{mg}_{\text{mta}}$).



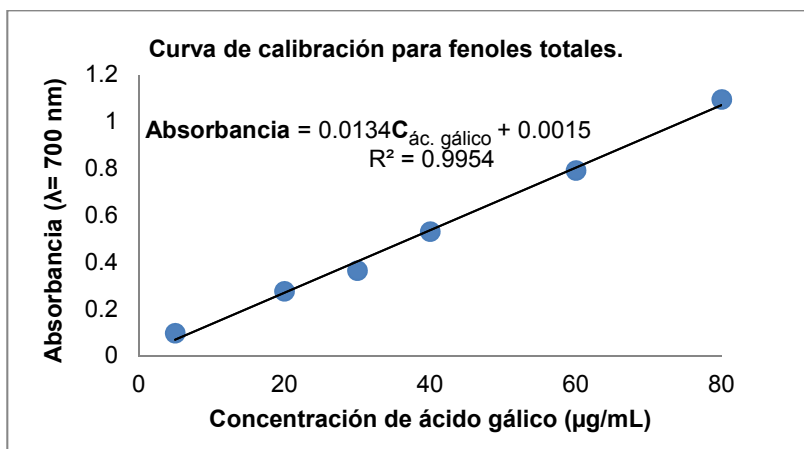
Gráfica 1. Curva de calibración para determinar el contenido de flavonoides totales.

5.4.2. Determinación de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales se realizó en base al método descrito por Singleton y Rossi (1965) con modificaciones. En el tubo de reacción se adicionaron 100 μL de solución metanólica de las muestras a analizar (1 mg/mL), 800 μL de agua y 100 μL de reactivo Folin-Ciocalteu (1:1). Se agitó y se dejó en

reposo por 8 minutos. Posteriormente se adicionaron 50 μL de Na_2CO_3 al 20%. Después de 1 hora en ausencia de luz se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter D4® 530 Life science UV/VIS.

En la Gráfica 2, se observa la curva de calibración de ácido gálico que se construyó en un intervalo de 5-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con la finalidad de expresar los resultados se muestran como el promedio de las determinaciones \pm desviación estándar y como equivalentes de ácido gálico por miligramo de muestra ($\mu\text{g}_{\text{ác.gálico}}/\text{mg}_{\text{mta}}$ o mg EAG/g).



Gráfica 2. Curva de calibración para determinar el contenido de fenoles totales.

5.5 Ensayo de blanqueamiento de β -caroteno

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo según el método de Thaipong (2006) con modificaciones. Se preparó una mezcla de reacción que consiste en una emulsión de β -caroteno de 1 mg/mL en CH_2Cl_2 , ácido linolénico, Tween 40 y H_2O desionizada, a la cual se adicionó la disolución acuosa de metanol al 50% del extracto total metanólico o de la fracción. Se realizó la lectura de tiempo cero en el espectrofotómetro a 470 nm y posteriormente se sometió la mezcla de reacción a baño maría a 50°C por 1 hora, al cabo de la cual se realizó la segunda medición, utilizando como blanco una emulsión de ácido linolénico, Tween 40 y H_2O desionizada. Como estándar se utilizó Trolox 0.5 mg/mL . Se calculó la actividad antioxidante (%AA) frente a un control de H_2O desionizada.

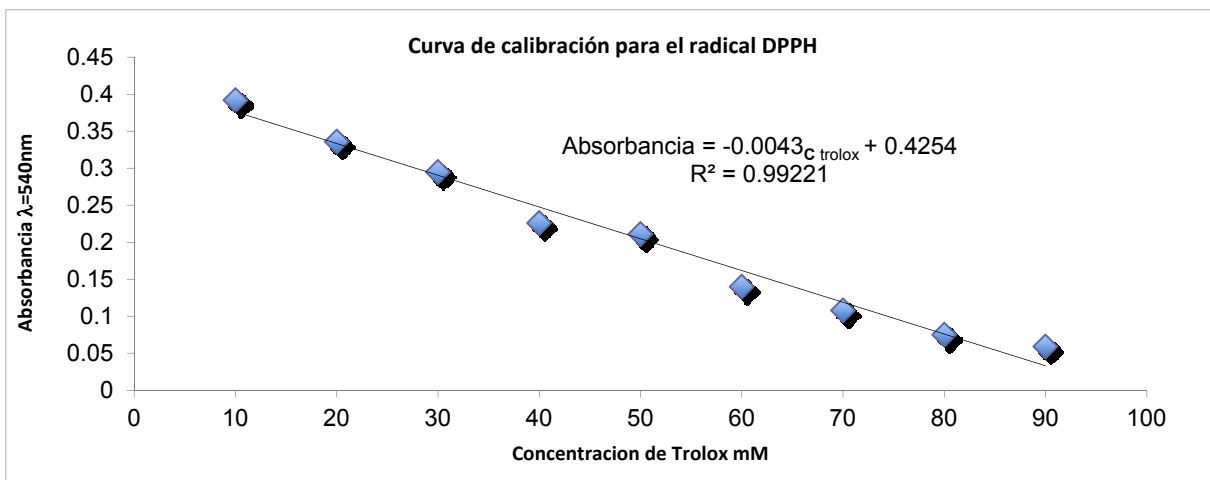
Cuadro 10. %AA (% Actividad Antioxidante) calculada frente a un control de H₂O desionizada para el ensayo de blanqueamiento de β-caroteno.

Blanqueamiento de β-caroteno	
Concentración de muestra (1.0 mg/1.0 mL)	%AA (%Actividad Antioxidante)
Control positivo C+	96.64 ± 0.57
Compuesto Hematoxilina.	94.07 ± 0.37
Extracto MeOH de corteza <i>H. brasiletto karst</i>	97.02 ± 0.30

5.6 Evaluación de la actividad antioxidante del extracto metanólico de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* y la hematoxilina.

5.6.1 Ensayo de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH·).

Se utilizó la metodología descrita por Rojano y colaboradores (2008) con algunas modificaciones. El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos. Se colocaron 100 µL de solución de cada muestra (1 mg/mL) y posteriormente se adicionaron 100 µL de solución etanólica de DPPH· 0.208 mM (Sigma-Aldrich Chem.Co. USA). La absorbancia fue medida después de incubar a temperatura ambiente por un periodo de 20 min a 540 nm en un espectrofotómetro lector de Elisa para microplaca Labsystem Multiskan® MCC/340. Cada muestra se ensayó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones ± la desviación estándar correspondiente. En la Gráfica 3, se presenta la curva de calibración del antioxidante comercial Trolox® que se construyó en un intervalo de concentración de 3.2-100 mM_{Trolox}. Los resultados se expresan como equivalentes de Trolox® por gramo de muestra (mM_{Trolox}/g_{mta} o TEAC).



Gráfica 3. Curva de calibración para determinar la capacidad de inhibición del radical DPPH \cdot .

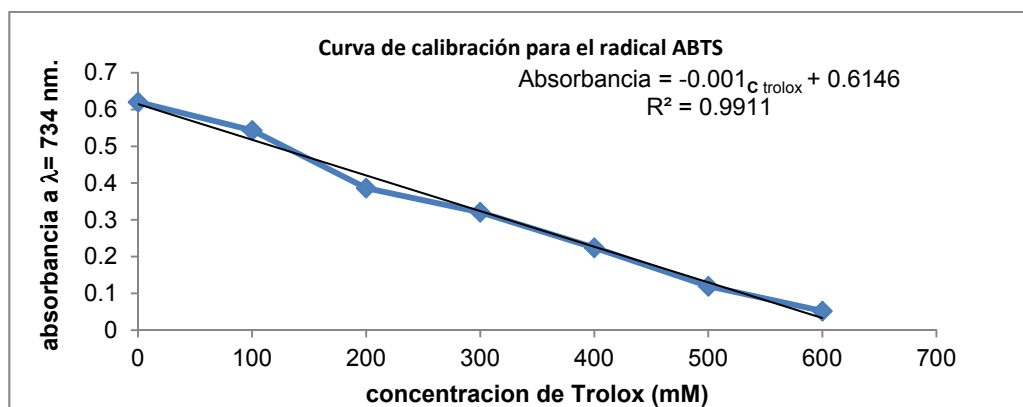
5.6.2. Ensayo de neutralización del radical libre catiónico del 2,2-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) [ABTS $^+$].

De acuerdo al método descrito por Kriengsak *et, al.* 2006, con algunas modificaciones. El radical ABTS $^+$ se formó por la reacción de oxidación de la solución 7mM de ABTS con una solución 2.45 mM de persulfato de potasio. La solución resultante se conservó durante 16 horas en ausencia de luz antes de su utilización. De esta forma la actividad antioxidante de las muestras, se evaluó con la capacidad de atrapamiento del radical ABTS $^+$. La solución del radical ABTS $^+$ se diluyó con MeOH hasta obtener una absorbancia inicial de al menos 0.70 a 734 nm.

El ensayo se realizó en placas de 96 pozos, se adicionaron 20 μL de solución de cada muestra (1mg/mL) y se colocaron 180 μL de la solución del radical ABTS $^+$ ajustados a la absorbancia de al menos 0.70. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 6 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 734 nm en un lector de Elisa. Cada muestra se realizó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones \pm la desviación estándar.

En la Gráfica 4, se puede observar la curva de calibración del antioxidante comercial Trolox $^{\text{®}}$ que se construyó en un intervalo de 0-600 $\text{mM}_{\text{Trolox}}$ y los

resultados se expresaron en equivalentes de Trolox® por gramo de muestra ($\text{mM}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{mta}}$ o TEAC).



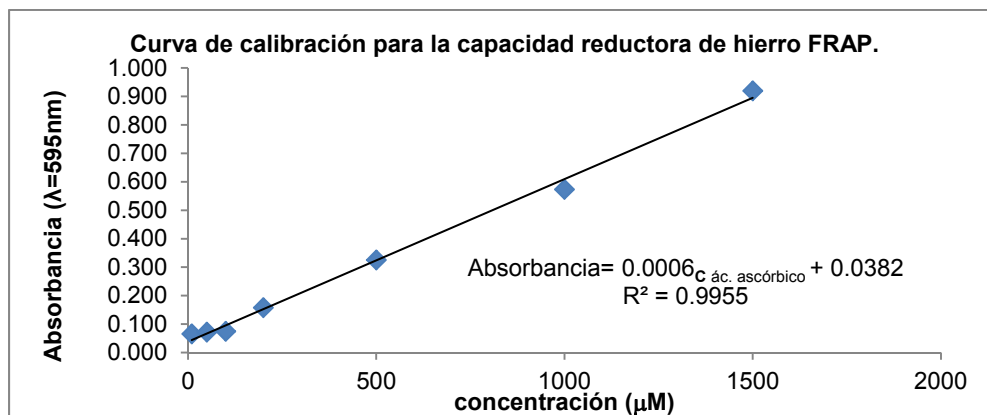
Gráfica 4. Curva de calibración para determinar la capacidad de atrapamiento del radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$.

5.6.3. Poder Antioxidante/Reducción de Fe^{3+} (FRAP)

El ensayo de FRAP se efectuó utilizando la metodología descrita por Strain (1996) con algunas modificaciones. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pozos, se colocó en cada pozo 20 μL de solución de la muestra (0.1 mg/mL), con 180 μL de la solución del reactivo de FRAP (2.5 mL de solución 2, 4, 6-tripiridil-S-triazina 10 mM en HCl 40 mM, 2.5 mL de FeCl_3 20 mM y 25 mL de buffer de acetato de sodio 300 mM a un pH de 3.6). Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, después se registró la absorbancia a 595 nm en un lector de Elisa.

Cada muestra se realizó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones \pm la desviación estándar correspondiente.

En la Gráfica 5, se muestra la curva de calibración de ácido ascórbico que se construyó en un intervalo de 10-1000 $\mu\text{M}_{\text{ác. ascórbico}}$ y los resultados se expresaron como equivalentes de ácido ascórbico por gramo de muestra ($\mu\text{M}_{\text{ác. ascórbico}}/\text{g}_{\text{mta}}$).



Gráfica 5. Curva de calibración para la determinación de la capacidad reductora de hierro.

5.7. Ensayo biológico. Evaluación de la actividad vasorrelajante.

5.7.1 Ensayo de aorta aislada de rata.

Se emplearon ratas de la cepa Wistar (ambos sexos), las cuales fueron anestesiadas con cloroformo y sacrificadas por decapitación. Se removió la aorta torácica y ésta se colocó en una solución fría de Krebs- Heinsleit (pH 7.4, 126.8 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 30 mM NaHCO_3 , 1.2 mM NaH_2PO_4 , 5 mM D- glucosa). Se eliminó el tejido adiposo y conectivo de la aorta y se cortaron anillos de 4-5 mm (Feelisch *et al.*, 1999; Forstermann *et al.*, 1994). Los anillos de aorta se montaron en cámaras de incubación de 7 ml conteniendo solución de Krebs-Heinsleit a 37°C , las cuáles se burbujearon constantemente con una mezcla de oxígeno-dióxido de carbono 95:5. Las contracciones mecánicas se registraron isométricamente por medio de transductores de fuerza Grass modelo FTO3 acoplados a un polígrafo Grass de 6 canales modelo 7-8 P.

El tejido se sometió a una tensión de reposo (basal) de 1.5 gr y se dejó equilibrar. Una vez que el tejido alcanzó el equilibrio, los segmentos se precontrajeron con una solución de KCl 100 mM que se aplicó 3 veces, a intervalos de 4 minutos,

lavando las cámaras entre cada aplicación. Después de la última aplicación se dejó reposar a la aorta hasta alcanzar su tensión basal nuevamente de 1.5 gr. A fin de determinar el nivel en el que actúan el extracto de *H. brasiletto* y la hematoxilina para modificar el tono del musculo liso vascular, se realizaron experimentos en los que, una vez estabilizado el tejido, los segmentos de aorta se contrajeron con fenilefrina (Phe) 1 μ M.

El extracto metanólico de la corteza del palo de Brasil y la hematoxilina se evaluó en un rango de concentraciones de 1 μ g/ml a 1000 μ g/ml. Las diferentes concentraciones 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 Phe. La respuesta inducida por cada una de las concentraciones del extracto en la aorta se registró durante 10 minutos y los cambios en la tensión producida por el extracto de prueba 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 contracción alcanzada al adicionar la Phe (Feelisch *et al.*, 1999).

5.7.2 Análisis de los datos obtenidos en evaluación farmacológica.

Se realizaron 4-6 evaluaciones para cada una de las concentraciones de las sustancias de prueba. En cada caso se calcularon los promedios \pm S. E. M. (del inglés: Standard Error of the Mean; error estándar del promedio). La construcción de las curvas concentración respuesta (CCR) se realizaron, mediante un programa de ajuste no lineal (PRISMA 5.0). En algunas CCR, se calculó la concentración efectiva media (CE_{50}) y el efecto máximo (E_{max}).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La selección de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* fue realizada con base en un criterio etnomédico, ya que, la especie es ampliamente utilizada en la Medicina Tradicional de México para el tratamiento de diversos padecimientos entre ellos, la hipertensión arterial. A pesar de que esta planta representa una fuente potencial de compuestos con efecto hipotensor, no se han realizado estudios clínicos controlados ni se ha probado su eficacia en animales de experimentación o en tejidos aislados. El ensayo de aorta aislada de rata es ampliamente utilizado para evaluar el efecto, *in vitro*, de extractos crudos o compuestos puros obtenidos de plantas sobre el tono del músculo liso vascular de segmentos de aorta de rata. La relativa facilidad del bioensayo y el requerimiento de pequeñas cantidades de sustancia para inducir un efecto en la aorta, hacen que este modelo sea muy apropiado para la evaluación preliminar del efecto farmacológico de *H. brasiletto* y la hematoxilina. En el ensayo usando diferentes agentes bioactivos permitieron determinar de manera preliminar el mecanismo de acción responsable del efecto vasodilatador producido por el extracto de *H. brasiletto*.

6.1 Obtención de la hematoxilina a partir del extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto*.

El extracto metanólico de la corteza del palo Brasil se obtuvo mediante un proceso de maceración con un rendimiento de 4.6%. El extracto activo inicial fue sometido a un fraccionamiento primario por partición utilizando como disolventes agua y acetato de etilo. Como resultado del proceso se obtuvo una fracción activa (AcOEt) que a su vez fue fraccionada por cromatografía de columna abierta utilizando Sephadex-LH20 como adsorbente y metanol como fase móvil. De este fraccionamiento se obtuvieron tres fracciones (CA-FI, CA-FII y CAF-III). La fracción activa **CA-FII** se recromatografió utilizando Sephadex-LH20 como adsorbente y metanol como fase móvil. De este fraccionamiento se obtuvieron seis fracciones secundarias (CB-FI a CB-FVI), la fracción **CB-FV** se cromatografió utilizando de nueva cuenta Sephadex-LH20 y metanol. De este proceso se obtuvieron tres

fracciones terciarias (CC-FI, CC-FII y CC-FIII). Finalmente, la fracción **CC-FII** se resolvió utilizando sílica gel C-18 y metanol-agua (50:50) como fase móvil, como resultado del proceso se obtuvieron nueve fracciones totales de CD-FI a CD-FIX.

A partir de la fracción CD-FII precipitó un sólido amorfo de color marrón, del cual se purificó el compuesto mayoritario, mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). Este compuesto fue identificado como la hematoxilina (**1**), por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con aquellas descritas en la literatura (Pratt y Yuzirihá, 1969; Rivero-Cruz, 2008). En el **Cuadro 11** se resumen los desplazamientos químicos de hidrógeno y las constantes de acoplamiento de la hematoxilina (**1**) para RMN-¹H, en la **Figura 5a y 5b** se muestran los espectros de RMN-¹H y de RMN-¹³C, respectivamente y en la **Figura 6** el cromatograma obtenido para la hematoxilina pura mediante CLAE.

Cuadro 11. Constantes espectroscópicas de la Hematoxilina.

Posición	RMN (δ_H)	Posición	RMN (δ_H)
1	6.74 (d, $J= 8.0$)	7 a	-
2	-	8	6.51 (s)
3	6.72 (d, $J= 8.0$)	9	-
4	-	10	-
4 a	-	11	6.49 (s)
5	-	11 a	-
6	4.04 (d, $J= 11.2$) 3.75 (d, $J= 11.2$)	11 b	4.0 (s)
6 a	-	11 c	-
7	3.25 (d, $J= 15.9$) 2.80 (d, $J= 15.9$)	-	-

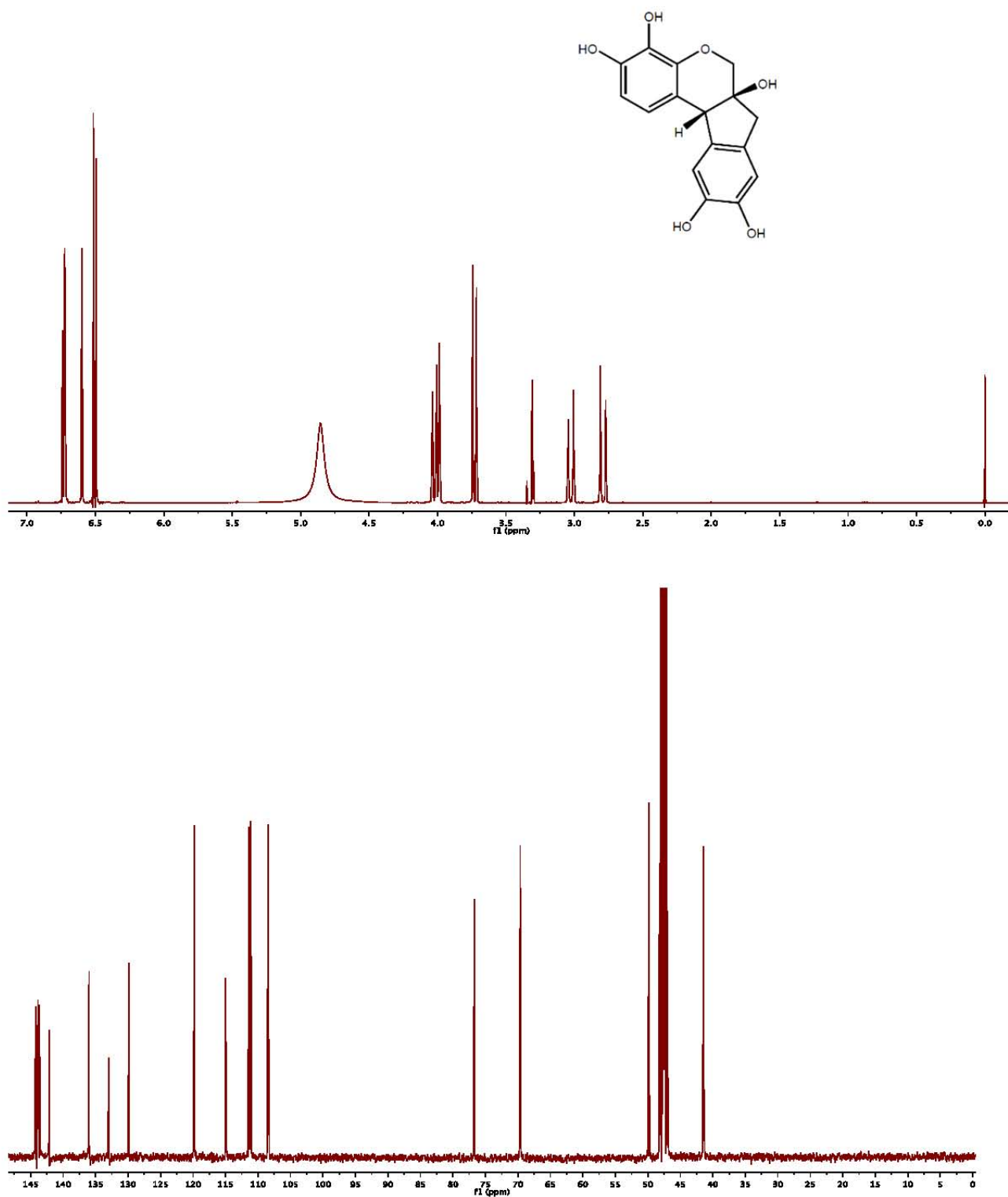


Figura 5. En la parte superior (A) se muestra el espectro de RMN-¹H, mientras que en la parte inferior (B) se muestra el espectro de RMN-¹³C de la hematoxilina.

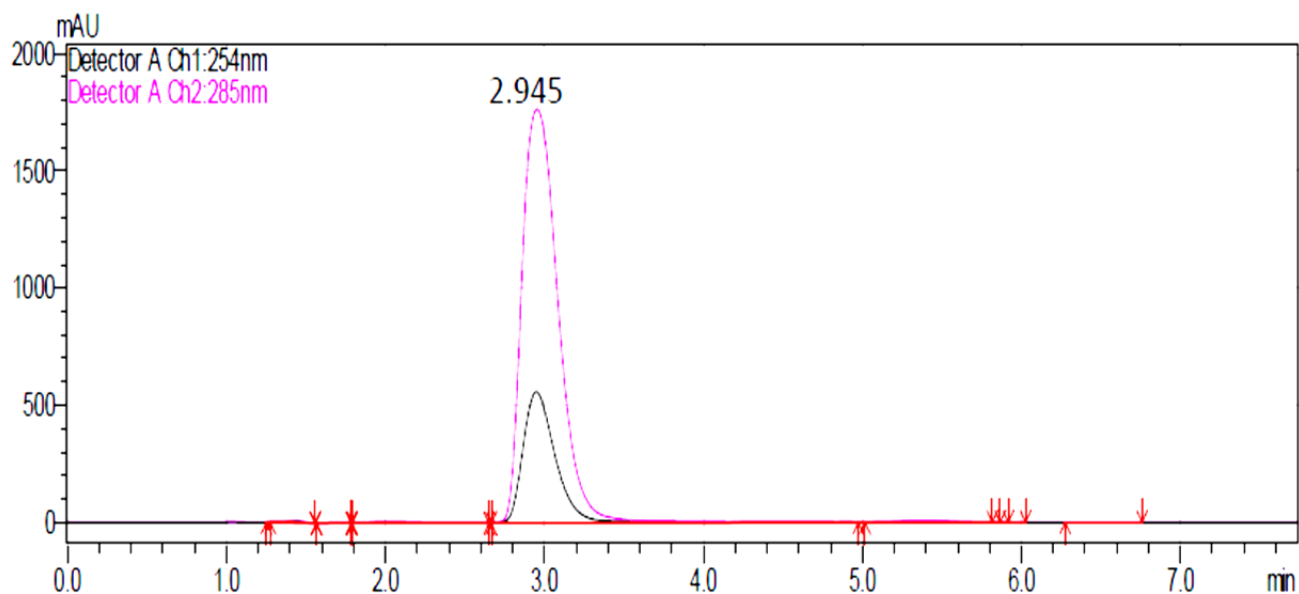


Figura 6. Cromatograma obtenido por medio de CLAE de la hematoxilina a dos longitudes de onda ($\lambda = 254 \text{ nm}$ y $\lambda = 285 \text{ nm}$), mostrando un tiempo de retención de 2.945 min.

6.2 Actividad antioxidante y vasorrelajante del extracto metanólico y hematoxilina obtenidos de la corteza de palo Brasil.

A partir del extracto metanólico y compuesto puro (hematoxilina) de la corteza de palo Brasil desecados, se realizaron los ensayos correspondientes para determinar su capacidad antioxidante utilizando los ensayos de DPPH, ABTS, FRAP blanqueamiento de β -caroteno, contenido de flavonoides y fenoles totales (Prior *et al.*, 2005).

En las **Gráficas 3, 4 y 5** se resumen los resultados de las curvas de calibración, estos se expresaron en unidades aceptadas internacionalmente como, la capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC) en los ensayos de DPPH y

ABTS y capacidad antioxidante en equivalentes de ácido ascórbico (AEAC) en el ensayo de FRAP.

Los valores obtenidos en el ensayo de DPPH y ABTS no muestran diferencias entre las muestras analizadas, sin embargo en el ensayo de FRAP, se observan diferencias, resultando el extracto metanólico el que presenta un mayor poder de reducir el hierro.

De acuerdo a las curvas de calibración obtenidas para DPPH y ABTS se determinó que el extracto metanólico derivado de la corteza, posee una capacidad inhibitoria frente al radical DPPH[•] de 763.72 ± 0.27 TEACs, 435.74 ± 10.27 TEACs de inhibición al radical catiónico ABTS^{•+} y una capacidad de reducir a hierro de $298.333 \pm 0.51 \mu\text{M}_{\text{ác. ascórbico}}/\text{mg}_{\text{mta}}$. La hematoxilina posee una capacidad atrapadora de los radicales DPPH[•] y ABTS^{•+} de 753.26 ± 0.71 y 421.78 ± 9.4 TEACs, respectivamente. Por otra parte, el compuesto presentó una capacidad reductora del hierro de $122.22 \pm 0.62 \mu\text{M}_{\text{ác. ascórbico}}/\text{mg}_{\text{mta}}$.

Los resultados anteriores demuestran que el extracto metanólico del palo Brasil y la hematoxilina poseen una actividad antioxidante significativa en los tres ensayos realizados. La actividad del extracto metanólico y la hematoxilina fue similar a la obtenida para el Trolox y el ácido ascórbico utilizados como controles. Por otra parte, es importante mencionar que el extracto presentó una mejor actividad antioxidante que el homoisoflavonoide hematoxilina, el Trolox y el ácido ascórbico. Otra forma de evaluar la actividad antioxidante de los polifenoles es midiendo la inhibición de la autooxidación de los lípidos en el ensayo de blanqueamiento del β -caroteno. Según los resultados obtenidos, tanto el extracto metanólico como la hematoxilina tienen la capacidad para evitar la oxidación del β -caroteno, lo cual se reflejó en una mínima disminución de la absorbancia y un alto %AA como se muestra en el **Cuadro 10**.

El contenido de fenoles totales presentes en el extracto se determinó utilizando el método de Folin-Ciocalteu, el palo Brasil contenía 61.1 ± 0.57 mg de ácido gálico/mg de muestra. En cuanto al ensayo de contenido de flavonoides totales

siguiendo la metodología descrita por Kumazawa (2004) con modificaciones, el extracto metanólico presento 58.46 ± 0.93 μg equivalentes de quercetina/mg de muestra.

Es importante destacar que el contenido de fenoles y el contenido de flavonoides representa un parámetro importante para establecer la calidad del material y su potencial biológico, en especial la actividad antioxidante. En el **Cuadro 12** se resumen los parámetros descriptivos de la capacidad antioxidante del extracto y la hematoxilina en los ensayos de DPPH, ABTS, FRAP, blanqueamiento de β -caroteno, contenido de fenoles y flavonoides totales.

Cuadro 12. Parámetros descriptivos de la capacidad antioxidante mediante los ensayos de blanqueamiento de DPPH, ABTS, FRAP, flavonoides totales, fenoles totales y blanqueamiento de β -caroteno, para el extracto total metanólico, la fracción de AcOEt y la hematoxilina.

	DPPH	ABTS	FRAP	Flavonoides Totales	Fenoles Totales	Blanqueamiento de β -caroteno
Concentración de muestra (1.0 mg/1.0 mL)	TEAC (mM)	TEAC (mM)	μmol ácido ascórbico/g muestra	μg de quercetina/mg de muestra	mg de ácido gálico/mg de muestra	%AA (%Actividad Antioxidante)
Control positivo C+	749.77 ± 0.78	407.44 ± 5.6	108.33 ± 0.41	50.30 ± 0.91	52.8 ± 0.38	96.64 ± 0.57
Compuesto Hematoxilina.	753.26 ± 71	421.78 ± 9.4	122.22 ± 0.62			94.07 ± 0.37
Extracto MeOH de corteza <i>H. brasiletto</i>	763.72 ± 0.27	435.74 ± 10.27	298.33 ± 0.51	58.46 ± 0.93	61.1 ± 0.57	97.02 ± 0.30
Fracción de AcOEt	701.64 ± 0.59	405.2 ± 0.69	126.2 ± 0.89	53.75 ± 0.47	56.2 ± 0.69	86.7 ± 0.69

Por otra parte, el extracto metanólico se evaluó en el ensayo de aorta aislada de rata con la finalidad de determinar su actividad vasorrelajante y los resultados nos muestran que indujo la relajación de segmentos intactos de la aorta aislada de rata con una concentración efectiva media (EC_{50}) = 111.5 ± 8.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y efecto máximo (E_{max}) = $98.3 \pm 1.7\%$, dependientes de la concentración, como se muestra en la **Figura 7**.

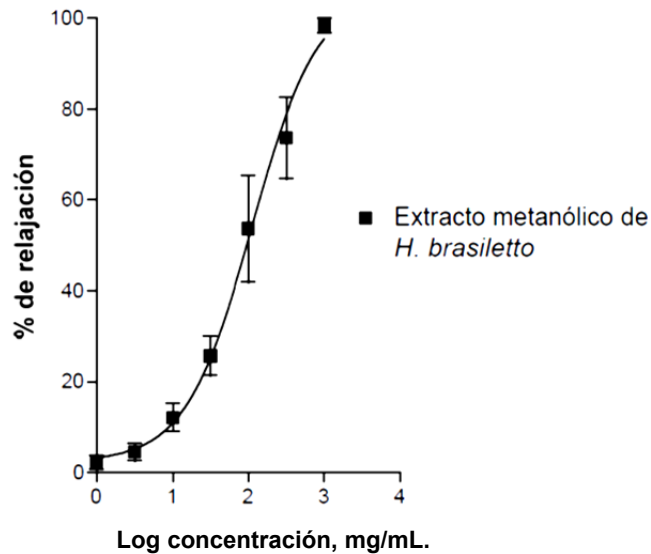


Figura 7. Efecto del extracto metanólico de la corteza de la especie vegetal *Haematoxylon brasiletto* (Leguminosae) sobre el tono del músculo liso vascular.

6.3 Comparación del efecto relajante del extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto* con el efecto inducido por la acetilcolina y el nitroprusiato de sodio en segmentos intactos de aorta de rata.

La comparación del efecto relajante de extracto de *H. brasiletto* con el efecto producido por la acetilcolina (ACh), agente vasorrelajante que se utilizó como control negativo y activador de la vía del NO/GMPc que depende de endotelio, y el nitroprusiato de sodio (SNP), un activador de la misma vía bioquímica, el cual actúa independientemente de la presencia de endotelio vascular, sobre los segmentos intactos de aorta, indicó que el extracto de *H. brasiletto* posee un efecto relajante quince veces menor que la ACh ($EC_{50} = 7.19 \pm 1.4 \mu\text{g/ml}$) y más de 40,000 veces menor que el SNP ($EC_{50} = 0.003 \pm 0.0003 \mu\text{g/ml}$). Sin embargo, la eficacia del extracto de la corteza de *H. brasiletto* resultó ser significativamente mayor que la presentada por la ACh ($E_{\text{max}} = 68.94 \pm 9.7\%$) y similar a la del SNP ($E_{\text{max}} = 100 \pm 1\%$) (**Figura 8**). El E_{max} , la EC_{50} y la potencia del SNP, la ACh y el extracto de *H. brasiletto* se muestran en el **Cuadro 11**.

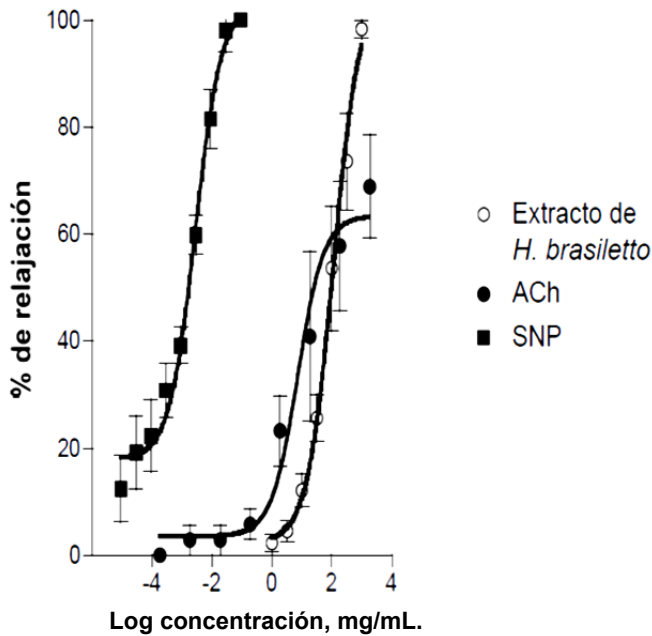


Figura 8. Comparación de las curvas concentración-respuesta del efecto relajante del SNP, la ACh y el extracto de *H. brasiletto* en segmentos de aorta intacta de rata.

Cuadro 13. EC_{50} , E_{max} y potencia del efecto relajante inducido por el extracto de *H. brasiletto*, la ACh y el SNP sobre la contracción inducida por fenilefrina en segmentos de aorta intacta de rata.

Especie/compuesto	EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	E_{max} (%)	Potencia
<i>H. brasiletto</i>	111.5 ± 8.4	98.3 ± 1.7	1
Ach	7.19 ± 1.4	68.9 ± 9.7	15
SNP	0.003 ± 0.0003	100 ± 1	>40,000

6.4 Determinación del efecto del extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto* sobre segmentos de aorta de rata en ausencia de endotelio.

Para determinar, si los compuestos vasodilatadores presentes en el extracto de la corteza de *H. brasiletto* interaccionan con receptores en las células endoteliales o directamente con receptores localizados en la célula muscular lisa, se evaluó el efecto de este extracto sobre la aorta aislada de rata en ausencia de endotelio vascular. Los resultados de estos experimentos indicaron que el efecto vasorrelajante 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 vasorrelajante de los compuestos presentes en la corteza de *H. brasiletto* (**Figura 9**).

Sin embargo, el hecho que el efecto vasorrelajante no fuera completamente eliminado en segmentos de aorta sin endotelio, sugirió que los compuestos vasoactivos son capaces de relajar la aorta por un mecanismo alternativo, el cual no requiere de la presencia del endotelio vascular.

6.5 Determinación de la activación de la vía del NO/GMPc por los compuestos bioactivos presentes en el extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto* 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), originando un incremento en los niveles del NO. El NO activa a su proteína receptora, la enzima guanilato ciclasa soluble (sGC), 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 y col., 2000).

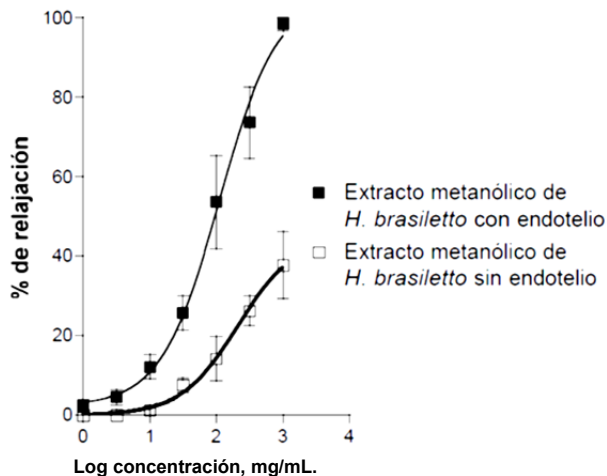


Figura 9. Curvas concentración-respuesta del efecto vasorrelajante producido por el extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto* en anillos de aorta intacta y en ausencia de endotelio.

En este estudio se determinó el papel que juega la activación de la vía NO/GMPc en el efecto relajante producido por el extracto de la corteza de *H. brasiletto*. Para llevar a cabo este experimento, se construyó la curva concentración-respuesta de efecto vasorrelajante del extracto de *H. brasiletto*, sobre la contracción inducida por fenilefrina, en presencia y en ausencia, del inhibidor inespecífico de la NOS, NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) o del inhibidor específico de la GCs, ODQ. Tanto NOS como sGC son enzimas indispensables para inducir el efecto relajante que da como resultado la activación de la vía del NO/GMPc.

Los resultados obtenidos de estos experimentos mostraron que el extracto de la corteza de *H. brasiletto* contiene compuestos capaces de activar la vía del NO/GMPc, ya que tanto en la inhibición de la proteína GCs como en la de la NO se desplazaron las curvas concentración-respuesta a la derecha (**Figuras 10 A, B**). La inhibición de dos de las proteínas más importantes de la vía del NO/GMPc disminuyó considerablemente el efecto vasorrelajante del extracto de *H. brasiletto*, sugiriendo que el efecto vasorrelajante observado por el extracto se debe, al menos en parte, a la activación de esta vía bioquímica.

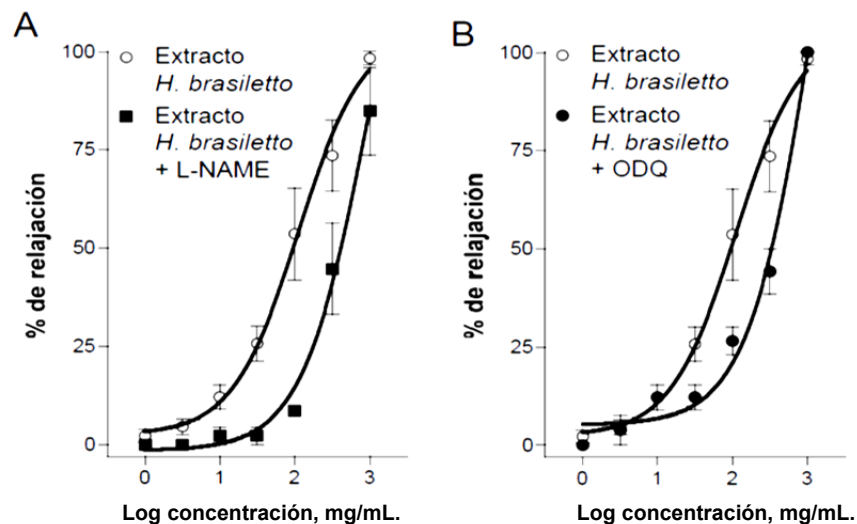


Figura 10. Curvas concentración- respuesta del efecto vasorrelajante producido por el extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto* sobre la contracción

inducida por fenilefrina en anillos de aorta en presencia y en ausencia de **A.** L-NAME ó **B.** ODQ.

6.6 Determinación de la participación de receptores a ACh muscarínicos en el efecto relajante producido por el extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto*.

Con la finalidad de determinar con qué tipo de receptores, a nivel endotelial, podrían interaccionar los compuestos vasoactivos presentes en el extracto de *H. brasiletto* para activar la vía NO/GMPc y dar como resultado el efecto relajante observado, se construyó la curva concentración-respuesta del efecto del extracto de la corteza de esta planta sobre la contracción inducida por fenilefrina, en presencia y ausencia, de atropina, un antagonista inespecífico de los receptores a ACh muscarínicos.

Los resultados obtenidos indicaron que este tipo de receptores no está involucrado en el efecto relajante producido por el extracto de *H. brasiletto*, ya que la inhibición de los receptores muscarínicos por la atropina no redujo de manera significativa el efecto vasodilatador del extracto (**Figura 11**).

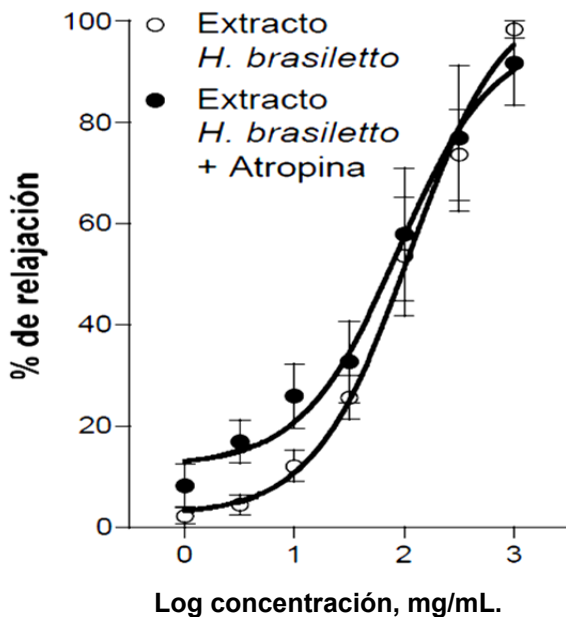


Figura 11. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante producido por el extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto* sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta en presencia y en ausencia de atropina.

6.7 Determinación de la activación de la vía de la PGI₂/AMPc por el extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto* empleando aorta intacta de rata.

La otra importante vía bioquímica que regula 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, que activa receptores membranales en la célula muscular.

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 *et al.*, 1990). Para determinar si la relajación producida por el extracto de *H. brasiletto*, 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 extracto de *H. brasiletto*, ya que la inhibición de la ciclooxigenasa no modificó la curva concentración-respuesta de dicho extracto (Figura 12).

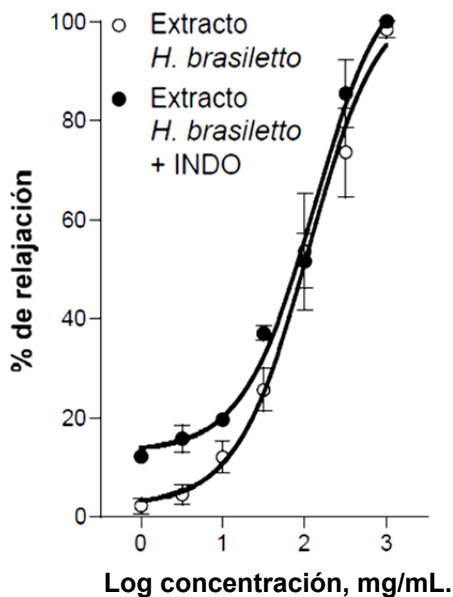


Figura 12. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante producido por el extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto* sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta en presencia y en ausencia de indometacina.

6.8 Determinación de la participación de la activación de canales de potasio en el efecto relajante producido por el extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto*.

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 el extracto de la corteza de *H. brasiletto*, se construyó la curva concentración-respuesta del extracto en presencia de cloruro de tetraetilamonio (TEA), un bloqueador no selectivo de canales de potasio (**Figura 13**).

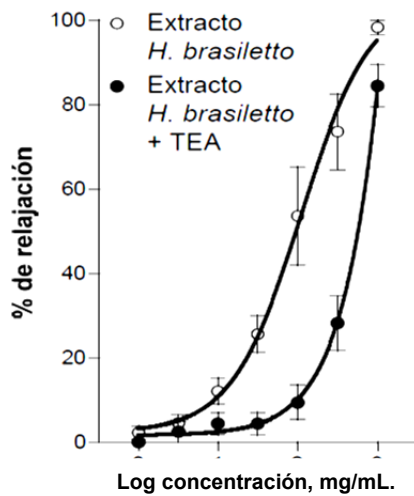


Figura 13. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante producido por el extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto* sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta en presencia y en ausencia de TEA.

El bloqueo de los canales de potasio con TEA redujo considerablemente el efecto relajante producido por el extracto de *H. brasiletto*, lo cual sugirió que la corteza de esta planta contiene compuestos capaces de activar este tipo de canales,

contribuyendo de esta manera al efecto relajante producido por esta especie vegetal.

6.9 Determinación del efecto vasorrelajante de la hematoxilina obtenida a partir del extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto* sobre la musculatura lisa arterial.

A partir del extracto metanólico se aisló la hematoxilina (**Figura 14**), el neoflavonoide presente en mayor cantidad en dicho extracto. En estudios previos ya se había reportado la presencia de este flavonoide en la corteza de *H. brasiletto* (Sánchez-Marroquín *et al.*, 1958; Pratt y Yuzuriha, 1959). Sin embargo, no existen reportes que describan con detalle su mecanismo de acción anti-hipertensor. Por esta razón, se evaluó el efecto de este compuesto sobre el tono del músculo liso arterial y se observó que la hematoxilina relaja ($CE_{50} = 702.8 \pm 45.3 \mu\text{g/ml}$; $E_{\text{max}} = 97.3 \pm 2.7\%$) la aorta de manera similar, aunque con menor potencia, al extracto metanólico (**Cuadro 14 y Figura 15**). Estos resultados sugirieron que el efecto vasorrelajante producido por el extracto de esta planta se debe principalmente al efecto producido por la hematoxilina, su compuesto mayoritario.

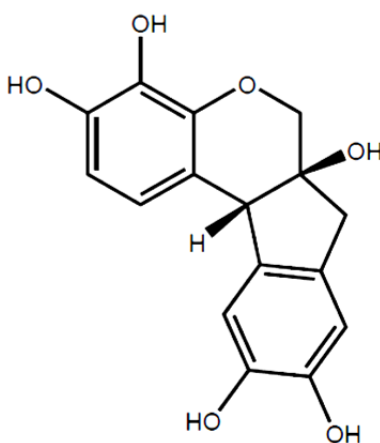


Figura 14. Estructura química de la hematoxilina obtenida del extracto metanólico de *H. brasiletto*.

El extracto de la corteza de *H. brasiletto* resultó ser 6 veces más potente que la hematoxilina, lo que sugiere que el extracto contiene otros compuestos vasorrelajantes que incrementan el efecto vasodilatador del extracto de esta especie vegetal.

Cuadro 14. EC_{50} , E_{max} y potencia del efecto relajante inducido por el extracto de *H. brasiletto* y la hematoxilina sobre la contracción inducida por fenilefrina en segmentos de aorta intacta de rata.

Especie/compuesto	EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	E_{max} (%)	Potencia
<i>H. brasiletto</i>	111.5 ± 8.4	98.3 ± 1.7	6
Hematoxilina	702.8 ± 45.3	97.3 ± 2.7	1

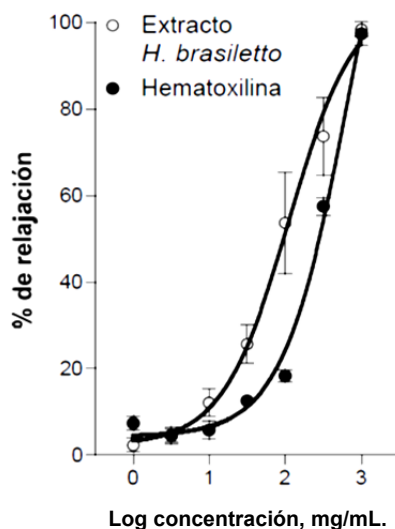


Figura 15. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante producido por el extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto* y la hematoxilina, su compuesto mayoritario, sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta

7. CONCLUSIONES.

- La información científica generada en esta investigación representa una contribución al conocimiento biológico de la especie *Haematoxylon brasiletto* Karst.
- El estudio de las propiedades antioxidantes del extracto metanólico preparado a partir de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* permitió establecer que posee un potente efecto antioxidante con TEACs de 763.72 ± 0.27 y 435.74 ± 10.27 para los radicales DPPH y ABTS, respectivamente. Por otra parte, el extracto metanólico contiene compuestos que relajan la musculatura lisa vascular de una manera dependiente de la concentración, los resultados nos mostraron que indujo la relajación de segmentos intactos de la aorta aislada de rata con una concentración efectiva media (EC_{50}) = $111.5 \pm 8.4 \mu\text{g/ml}$ y un efecto máximo (E_{max}) = $98.3 \pm 1.7\%$.
- La hematoxilina aislada a partir de la fracción activa CD-FV constituye el compuesto antioxidante mayoritario de la corteza de palo Brasil con TEACs de 753.26 ± 71 y 421.78 ± 9.4 para los radicales libres DPPH y ABTS, respectivamente. Este compuesto puro presentó un efecto relajante de la musculatura lisa vascular con una $CE_{50} = 702.8 \pm 45.3 \mu\text{g/ml}$ y un $E_{\text{max}} = 97.3 \pm 2.7\%$.
- El mecanismo de acción de los compuestos presentes en el extracto de *H. brasiletto* involucra dos mecanismos diferentes: uno dependiente de endotelio, en el que se activa la vía del NO/GMPc y otro independiente de endotelio, en el que se activan canales de K^+ activados por Ca^{2+} .
- Los compuestos vasodilatadores presentes en el extracto de *H. brasiletto* no ejercen su efecto farmacológico mediante la activación de receptores colinérgicos muscarínicos ni a través de la activación de la vía de la $PGI_2/AMPc$.

8. PERSPECTIVAS.

- Continuar el estudio fitoquímico de las fracciones primarias y secundarias, que no fueron analizadas en el presente proyecto, con la finalidad de aislar algunos de los compuestos minoritarios presentes, y posteriormente determinar su posible actividad biológica.
- Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia que permita cuantificar los principios activos del extracto total de la corteza de *Haematoxylon brasiletto*, así como sus compuestos minoritarios.
- Determinar el mecanismo de acción mediante el cual la hematoxilina ejerce su efecto vasorrelajante.

9. REFERENCIAS.

Abe, S., Kanaide, H. y Nakamura, M. **1990**. Front- surface fluorometry and effects of nitroglycerin on cytosolic calcium concentrations and on tension in the coronary artery of the pig. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 101: 545-52.

Ani, V., Varadaraj M.C., Naidu K.A. **2006**. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). *European Food Research and Technology*. Vol. 224: 117-119.

Aguilar, A., **2001**. Plantas Medicinales del centro de México. Guías de México desconocido. México: 145-147

Andriantsitohaina, R., Lagaud G. J., Andre A., Muller B. y Stoclet J. C. **1995**. Effects of cGMP on calcium handling in ATP- stimulated rat resistance arteries. *American Journal of Physiology*. Vol. 268: H1223-H1231.

Argueta, A. **1994**. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Primera ed., Instituto nacional Indigenista, México. Tomo I: 393-394, 644-645; tomo II: 775- 776, 927-929 y tomo III: 1355-1356.

Bennett, B. M. y Waldman, S. A. **1995**. Cyclic nucleotides and protein phosphorylation in vascular smooth muscle relaxation, In *Physiology and Pathophysiology of the Heart*, ed Sperelakis, pp, 975-998. Boston, MA; Kluwer academic Publishers.

Bunting S., Gryglewski R., Moncada S. y Vane J.R. **1976**. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins*. Vol. 12: 897-913.

Calderone V., Chericoni S., Martinelli C., Testai L., Nardi A., Morelli I., Breschi M. C. y Martinotti E. **2004**. Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*. Vol. 370(4): 290-8.

Carroll KK, Guthrie N, SO FV, and Chambers AS: *Anticancer properties of flavonoids, with emphasis on citrus flavonoids*. En: Rice-Evans CA, Packer L. Eds. *Flavonoids in Health and Disease*. New York. Marcel-Dekker, **1998**: 437-446.



- Chan E. C.** y **Woodman O. L.** **1999**. Enhanced role for the opening of potassium channels in relaxant responses to acetylcholine after myocardial ischaemia and reperfusion in dog coronary arteries. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 126(4): 925-932.
- Chin-Dusting J. P.**, **Fisher L. J.**, **Lewis T. V.**, **Piekarska A.**, **Nestel P. J.** y **Husband, A.** **2001**. The vascular activity of some isoflavone metabolites: implications for a cardioprotective role. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 133: 595-605.
- Chou S. C.**, **Everngam M. C.**, **Sturtz G.** y **Beck J. J.** **2006**. Antibacterial activity of components from *Lomatium californicum*. *Phytotherapy Research*. Vol. 20: 153-156.
- Christ J. G.** y **Brink P. R.** **2000**. Gap junctions in isolated rat aorta: evidence for contractile responses that exhibit a differential dependence on intracellular communication. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Vol. 33: 423-429.
- Coleman R. A.**, **Smith W. L.** y **Naruiya S.** **1994**. International union of pharmacology classification of prostanoid receptors and their subtypes. *Pharmacological Reviews*. Vol. 45: 205- 229.
- Cooksey C.**, **2009**. Hematoxylin and related compounds -an annotated bibliography concerning their origin, properties, chemistry, and certain applications', *Biotechnic and Histochemistry*, Vol. 84 No. 4, pp. 123 -134.
- Córdoba J.**, **Hernández M.** **2008**. Programa de acción específico. Riesgo cardiovascular. Vol. I: 11-18.
- Cordell G. A.** **2000**. Biodiversity and drug discovery: a symbiotic relationship. *Phytochemistry*. Vol. 55: 463-480.
- Cragg G. M.**, **Newman D. J.** y **Snader K. M.** **1997**. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*. Vol. 60: 52 60.
- Craig J. C.**, **Naik A. R.**, **Pratt R.** y **Johnson E.** **1965**. Nuclear magnetic spectra and stereochemistry of the antibacterial principle of *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of Organic Chemistry*. Vol. 30: 1573–1576.
- Crespo A. E.**, **2006**. Enfermedades Cardiovasculares, principal asesino en el mundo. www.elperiodicodemexico.com/nota.php?sec=Salud&id=31293.



- Dejana E.**, Corada M. y Lampugnani M. G. **1995**. Endotelial cell-to-cell junctions. *FASEB Journal*. Vol. 9: 910-918.
- Dirección General de Epidemiología (DGE)**, Secretaría de salud. **2001**. www.dgepi.salud.gob.mx7diveent/RNICCOPE.htm.
- Duarte J.**, Perez-Vizcaino F., Utrilla P., Jimenez J., Tamargo J., Zarzuelo A. *Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships*. *Gen Pharmacol*. **1993b**; 24:857-62.
- Duarte J.**, Pérez-Vinzcaíno F., Jiménez J., Tamargo J., Zarzuelo A. *Flavonoids and cardiovascular diseases*. En: Atta-Ur-Rahman. Ed. *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol 25, part F. Amsterdam. Elsevier, **2001**: 565-605.
- Duarte J.**, Perez-Vizcaino F., Zarzuelo A., Jimenez J., Tamargo J. *Vasodilatory effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle*. *Eur J. Pharmacol*. **1993a**; 239, 1-7.
- 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*. Vol. 56: 243-253.
- Fukao M.**, Mason H. S., Britton F. C., Kenyon J. L., Horowitz B. y Keef K. D. **1999**. Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 274: 10927-35.
- Furukawa K.**, Ohshima N., Tawada- Iwata Y. y Shigekawa, M. **1991**. Cyclic GMP stimulates Na⁺/Ca²⁺ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 266: 12337-41.
- Guerrero M. F.**, Puebla P., Carron R., Martin M. L. y San Roman L. **2002**. Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Vol. **54**: 1373- 1378.
- Harborne J. B.** y Williams C. A. **2000**. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. Vol. 55: 481-504.



- Heredia** N., Escobar M., Rodriguez-Padilla C. y Garcia S. **2005**. Extracts of *Haematoxylon brasiletto* inhibit growth, verotoxin production, and adhesion of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Journal of Food Protection*. Vol. 68: 1346-1351.
- Hertog** M. G., Hollman P. C., Katan M. B. y Kromhout D. **1993**. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutrition and Cancer*. Vol. 20: 21-29.
- Hofmann** F., Ammendola A. y Schlossmann J. **2000**. Rising behind NO: cGMP dependent protein kinases. *Journal of Cell Science*. Vol. 113: 973- 983.
- Huxley** H.E. **1969**. The mechanism of muscular contraction. *Science*. Vol. 164: 1356-1366.
- Ibarra-Alvarado** C., Galle J., Melichar V. O., Mameghani A. y Schmidt H. H. **2002**. Phosphorylation of blood vessel vasodilator-stimulated phosphoprotein at serine 239 as a functional biochemical marker of endothelial nitric oxide/cyclic GMP signaling. *Molecular Pharmacology*. Vol. 61: 312-319.
- Ignarro** L. J. **1990**. Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacology & Toxicology*. Vol. 67: 1-7.
- Kargacin** G. J., Cooke P. H., Abramson S. B. y Fay F. S, **1989**. Periodic organization of the contractile apparatus in smooth muscle revealed by the motion of dense bodies in single cells. *Journal of Cell Biology*. Vol. 108: 1465-1475.
- Komalavilas** P. y Lincoln T. M. **1996**. Phosphorylation of the inositol 1, 4, 5 trisphosphate receptor. Cyclic GMP- dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 271: 21933-21938.
- Kubo** I., Fujita K., Nihei K. y Nihei A. **2004**. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Bacillus subtilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 52: 1072-1076.
- Kriengsak** T., Unaroj B., Crosby K., **2006**. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675.



- Kumazawa S.**, Hamasaka T., Nakayama T., **2004**, Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84, 329-339.
- Linares E.** , Flores B. y Bye R. **1994**. Selección de Plantas Medicinales de México. 1era. Ed., Limusa. México: 10-15.
- 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, México City, Ciba Foundation symposium 185: 130-152.
- Lucas K. A.**, Pitari G. M., Kazerounian S., Stewart I., Park J., Schulz S., Chepenik K. P. y Waldman S. A. **2000**. Guanylyl cyclases and signalling by cyclic GMP. *Pharmacological Reviews*. Vol. 52: 375-414.
- Manderfeld M. M.**, Schafer H. W., Davidson P. M. y Zottola E. A. **1997**. Isolation and identification of antimicrobial furocoumarins from parsley. *Journal of Food Protection*. Vol. 60: 72-77.
- Marijic J.**, Li Q., Song M., Nishimaru K., Stefani E. y Toro L. **2001**. Decreased expression of voltage- and Ca^{2+} -activated K^+ channels in coronary smooth muscle during aging. *Circulation Research*. Vol. 88(2): 210-216.
- Mittermier R. A.** **1988**. Biodiversity. In eds. E. O. W. y F. M. P. (ed.). Primate diversity and the tropical forest. National Academy Press, Washinton, D. C.: 145-154.
- Miwa S.**, Iwamuro Y., Zhang X. F., Enoki T., Okamoto Y., Okazawa M. y Masaki T. **1999**. Ca^{2+} entry channels in rat thoracic aortic smooth muscle cells activated by endothelin-1. *Japanese Journal of Pharmacology*. Vol. 80: 281-374.
- Moncada S.** y Higgs E. A. **1991**. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *European Journal of Clinical Investigation*. Vol. 21: 361-374.
- Murad F.** **1994**. Cyclic GMP: synthesis, metabolism, and function. Introduction and some historical comments. *Advances in Pharmacology*. Vol. 26: 1-5.
- Murad F.** **1996**. Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *Journal of the American Medical Association*. Vol. 276: 1189-1192.



- Navarro-Cid J.**, Cachofeiro V., Maeso R. y Lahera V. **1999**. Fisiología de la pared vascular, En: Tresguerras, J. A. F., Aguilar, E., Cachofeiro, M. D (Eds.), Fisiología humana, McGraw- Hill Interamericana, México: 525,532-539.
- Pacheco A.**, Gonzalez Y., Viso F. **2006**. Las reacciones adversas de las plantas medicinales y sus interacciones con medicamentos. MEDISAN. Vol. 10: 4-11.
- Palmer R. M.**, Ferrige A. G. y Moncada S. **1987**. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. Vol. 327: 524-526.
- Palomino, L.**, García, C., Gil, J., Rojano, B. y Durango, D., **2009**. Contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). Vitae. 16(3): 3388-395.
- Perez-Vizcaino F.**, Ibarra M., Cogolludo A. L., Duarte J., Zaragoza-Arnez F., Moreno L., Lopez-Lopez G. y Tamargo J. **2002**. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. Vol. 302: 66-72.
- Pratt R.** y Yuzuriha Y. **1959**. Antibacterial activity of the heartwood of *Haematoxylon brasiletto*. Journal of the American Pharmaceutical Association. Vol. 48: 69-72.
- Rasmussen H.**, Kelley G. y Douglas J. S. **1990**. Interactions between Ca^{2+} and cAMP messenger system in regulation of airway smooth muscle contraction. American Journal of Physiology. Vol. 258: L279-288.
- Rivero-Cruz F.** **2008**. Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 119: 99-103.
- Rubbo H.**, Darley-Usmar V. y Freeman B. A, **1996**. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. Chemical Research in Toxicology. Vol. 9: 809-820.
- Ruiz-Velasco V.**, Zhong J., Hume J. R. y Keef K. D. **1998**. Modulations of Ca^{2+} channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. Circulation Research. Vol. 82: 557-65.



- Sanchez-Marroquin A.**, Garcia L. y Mendez M. **1958**. Brazilin, antibacterial substance from *Haematoxylon brasiletto*. Revista Latinoamericana de Microbiologia. Vol. 1: 225–232.
- Smith C.** **2006**. Our debt to the logwood tree: the history of hematoxylin. Med. Lab. Obs. Vol. 38, No 18. Pp. 20-22.
- Schmidt H. H.**, Lohmann S. M. y Walter U. **1993**. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. Biochemical et Biophysica Acta. Vol. 1178: 153-175.
- Somlyo A. P.** y Somlyo A. V. **1994**. Signal transduction and regulation in smooth muscle. Nature. 372: 231-236.
- Stankevicius E.**, Kèvelaitis E., Vainorius E y Simonsen, U. **2003**. Role of nitric oxide and other endothelium derived factors. Medicina, Vol. 39: 333-341.
- Tamaoki J.**, Tagaya E., Nishimura K., Isoino K. y Nagai A. **1997**. Role of Na⁺-K⁺ ATPase in cyclic GMP- mediated relaxation of canine pulmonary artery smooth muscle cells. British Journal of Pharmacology. Vol. 122: 112-116.
- Thaipong k.**; Boonprakob U., Crosby K., Cisceros-Zevallos L., Byrne D. H. (2006) Comparison of ABTS, DDPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts, Journal of Food Composition and analysis, vol. 19:669-675.
- Van der Watt E.** y Pretorius J. C. **2001**. Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis*. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 76: 87-91.
- Velázquez-Monroy O.**, Rosas-Peralta M., Lara-Esqueda A., Pastelin-Hernandez G., Castillo C., Attie F. Y. y Tapia-Conyer R. **2003**. Prevalence and interrelations of noncommunicable chronic diseases and cardiovascular risk factors in México. Final outcomes from the National Health Survey 2000. ArchCardiol. México. Vol. 73: 62-77.