



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO



División Académica de Ciencias Básicas

**“EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD
ANSIOLÍTICA, PRESENTES EN *Haematoxylum
campechianum* (Fabaceae)”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
(ORIENTACIÓN EN QUÍMICA ORGÁNICA)**

PRESENTA

M. C. ARMANDO ESCOBAR RAMOS

DIRECTORES:

DR. MANASÉS GONZÁLEZ CORTAZAR.

DR. CARLOS ERNESTO LOBATO GARCÍA.

CUNDUACÁN, TABASCO, ENERO DE 2019.



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ciencias
Básicas



DIRECCIÓN

9 de mayo de 2018

M.C. Armando Escobar Ramos

Doctorado en Ciencias con Orientación
En Química Orgánica
Presente

Por medio del presente y de la manera más cordial, me dirijo a Usted para hacer de su conocimiento que proceda a la impresión del trabajo titulado "**Extracción y caracterización de metabolitos secundarios con actividad ansiolítica presentes en *Haematoxylum campechianum (Fabaceae)***", en virtud de que reúne los requisitos para el EXAMEN PROFESIONAL para obtener el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Química Orgánica.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente,

Dr. Gerardo Delgadillo Piñón
Director



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS BÁSICAS

C.c.p.- Archivo
Dr'GDP/Dr'JGPS/emt

Miembro CUMEX desde 2008
Consortio de
Universidades
Mexicanas
UNA ALIANZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

Km.1 Carretera Cunduacán-Jalpa de Méndez, A.P. 24, C.P. 86690, Cunduacán, Tab., México.
Tel/Fax: (993) 3581500 Ext. 6701 E-Mail: direccion.dacb@ujat.mx

www.ujat.mx

CARTA DE AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de grado denominada: "EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA, PRESENTES EN *Haematoxylum campechianum* (Fabaceae)" de la cual soy autor y titular de los derechos de autor.

La finalidad del uso de la tesis antes mencionada por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 22 días del mes de mayo del año 2018.

AUTORIZÓ

ARMANDO ESCOBAR RAMOS

MATRICULA: 152A25001

DEDICO ESTA TESIS CON SINCERA GRATITUD

A mis padres y hermanos por estar conmigo en cada etapa de mi vida.

A mis hijos Guillermo, Erick Armando y Evelyn porque son mi fuerza y el amor que me inspira.

A mis directores de tesis Dr. Manasés González Cortazar y Dr. Carlos Ernesto Lobato García por el tiempo dedicado a este trabajo y por su gran calidad científica y humana.

Al Dr. Alejandro Zamilpa por apoyarme en el análisis cromatográfico.

A la Dra. Maribel Herrera por su valiosa colaboración en el diseño de las pruebas de ansiedad.

A Arturo Pérez y Jonathan Orduño por el apoyo técnico en el trabajo de laboratorio.

A los administradores del Centro de investigación biomédica del sur, IMSS de Xochitepec, Morelos por permitirme desarrollar este trabajo en sus instalaciones.

A la División Académica de Ciencias Básicas de la UJAT por las facilidades brindadas para desarrollar mis estudios de posgrado.

Al CONACYT por el apoyo económico que me brindó a través del programa de becas.

A los miembros del H. Jurado por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por sus acertadas observaciones.

Todo tiene su tiempo...

ÍNDICE

TEMA	CAPÍTULO	PÁG.
Resumen		1
ANTECEDENTES	I	4
1.1 Uso de las plantas medicinales.		5
1.2 Problemas de salud mental por depresión y ansiedad en el mundo.		5
1.3 Depresión y ansiedad en México.		6
1.4 Material vegetal.		7
1.5 Usos tradicionales de <i>Haematoxylum campechianum</i> .		7
1.6 Estudios químicos realizados a <i>Haematoxylum campechianum</i> .		8
1.7 Disolventes polares y no polares.		9
1.8 Íleon de Cobayo.		10
1.9 Flavonoides.		10
1.10 Cromatografía líquida de alta resolución.		14
1.11 Resonancia magnética nuclear (RMN).		15
1.11.1 Técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) utilizadas.		17
1.12 Comparación de varianzas.		21
1.12.1 Conceptos básicos de ANOVA.		21
1.13 Objetivos.		23
MATERIALES Y MÉTODOS	II	24
2.1 Obtención de los extractos orgánicos.		25
2.2 Pruebas biológicas para determinar los extractos, fracciones y compuestos activos.		25
2.3 Evaluación de la actividad ansiolítica.		27
2.3.2 Evaluación del efecto ansiolítico mediante la prueba LEC.		27
2.3.3 Evaluación del efecto sedante mediante la prueba CA.		28
2.4 Fraccionamiento químico de los extractos orgánicos.		28
2.5 Equipo de resonancia magnética nuclear.		29
2.6 Determinación del punto de fusión.		29
2.7 Análisis estadístico.		29
OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS Y SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA	III	31
3.1 Obtención del material vegetal.		32
3.2 Macerado del material vegetal.		32

3.3 Separación cromatográfica de los compuestos químicos contenidos en el tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> .	33
3.3.1 Obtención de las fracciones del extracto metanólico.	33
3.3.2 Compuestos aislados del extracto metanólico.	34
3.3.3 Obtención de las fracciones del extracto acuoso.	37
3.3.4 Compuestos aislados del extracto acuoso.	38
EVALUACIÓN BIOLÓGICA <i>in vitro</i> . IV	40
4.1 Evaluación espasmolítica.	41
4.1.1 Evaluación espasmolítica de los extractos obtenidos del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> .	41
4.1.2 Evaluación espasmolítica de las fracciones F5 a F9 obtenidas del extracto metanólico.	45
4.1.3 Evaluación espasmolítica de las fracciones F4 a F10 obtenidas del extracto acuoso.	47
4.1.4 Evaluación espasmolítica de los compuestos 1-2 y 3a-5a .	49
PRUEBA DE ANSIEDAD EN LEC Y CA V	51
5.1 Prueba de laberinto elevado en forma de cruz (LEC).	52
5.1.1 Resultados de las pruebas LEC para el extracto metanólico.	52
5.1.2 Resultados de las pruebas LEC para el extracto hidroalcohólico.	54
5.1.3 Resultados de las pruebas LEC para sappanchalcona.	56
5.2 Prueba de campo abierto (CA).	58
5.2.1 Resultados de las pruebas de CA para el extracto metanólico.	58
5.2.2 Resultados de las pruebas de CA para el extracto acuoso.	60
5.2.3 Resultados de las pruebas de CA para sappanchalcona.	61
ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE <i>Haematoxylum campechianum</i> . VI	62
6.1 Identificación de los compuestos aislados.	63
6.2 Tablas de resultados de desplazamientos químicos para ^1H y ^{13}C .	71
CONCLUSIONES	73
APÉNDICE	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

ÍNDICE DE FIGURAS.

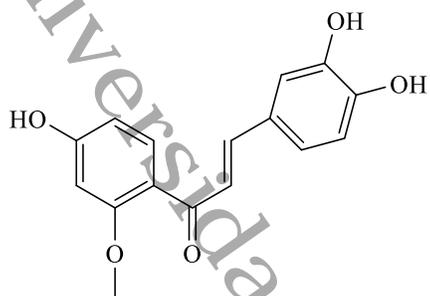
FIGURA	PÁG.
Fig. 1. Estructura molecular de los compuestos aislados de <i>Haematoxylum campechianum</i> .	3
Fig. 2. Estructura de flavanos: flavonoide 7 , isoflavonoide 8 , neoflavonoide 9 ; flavanol 10 , flavanona 11 , flavanonol 12 , flavona 13 , flavonol 14 , crisina 15 y apigenina 16 .	12
Fig. 3. Espectro H-H-COSY para el acetato de etilo.	19
Fig. 4. Estructura molecular del acetato de etilo.	20
Fig. 5. Árbol de <i>Haematoxylum campechianum</i> (a), madera con duramen (b) y duramen molido (c).	32
Fig. 6. Filtrado del extracto (a), recuperación del disolvente (b) y extracto seco (c).	33
Fig. 7. Placa CCF (diclorometano-metanol 9:1). Columna C5TTM. Revelador: 4-hidroxibenzaldehído. Estándar: Glucósido de β -sitosterol (G β) y Quercetina (Q). Referencia (R).	34
Fig. 8. Resultados del análisis CLAR de los 6 compuestos aislados de <i>Haematoxylum campechianum</i> .	36
Fig. 9. Placa CCF (diclorometano-metanol 9:1). Columna C6TTM. Revelador: Flavonoides.	37
Fig. 10. Placa CCF (Agua-Acetonitrilo 6:4). Columna C6TTAF5F4. Revelador: 4-hidroxibenzaldehído.	38
Fig. 11. Placa CCF (Agua-Acetonitrilo 7:3). Columna C6TTAF5F4F4. Revelador: 4-hidroxibenzaldehído.	39
Fig. 12. Equipo para pruebas espasmolíticas: Íleon de cobayo en el portamuestra (a), portamuestra del equipo (b) y aparato que controla los pulsos eléctricos aplicados (c).	41
Fig. 13. Relación dosis-respuesta de los extractos del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 50 a 400 μ g/ml, comparados con papaverina (+). * Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto a papaverina (SPSS 23).	43
Fig. 14. Relación dosis-respuesta del extracto metanólico y fracciones del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 50 a 400 μ g/mL comparados con papaverina (+). * Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto a papaverina (SPSS 23).	46
Fig. 15. Relación dosis-respuesta del extracto acuoso y fracciones del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 12.5 a 400 μ g/mL comparados con papaverina (+).	48
Fig. 16. Relación dosis-respuesta del efecto de relajación de los compuestos aislados del extracto metanólico para dosis de 25 a 200 μ g/ml, comparados con papaverina (+). * Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto a papaverina (SPSS 23).	49
Fig. 17. Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (TBA) y porcentaje de entradas a los brazos abiertos (EBA) en LEC. Prueba realizada administrando vía oral el extracto metanólico del tallo (EMT) de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 25 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg. * Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto al control (-) vehículo.	53
Fig. 18. Número de veces que el ratón se asoma y alza en dos patas en LEC. Prueba realizada administrando vía oral el extracto metanólico del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 25 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg. * Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto al control (-) vehículo.	54
Fig. 19. Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (TBA) y porcentaje de entradas a los brazos abiertos (EBA) en LEC. Prueba realizada administrando vía oral el extracto acuoso del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 50 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.	55

	* Diferencia significativa (p =0.05) respecto al control (-) vehículo.	
Fig. 20.	Número de veces que el ratón se asoma y alza en dos patas en LEC. Prueba realizada administrando vía oral el extracto acuoso del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 50 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg. * Diferencia significativa (p =0.05) respecto al control (-) vehículo.	56
Fig. 21.	Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (TBA) y porcentaje de entradas a los brazos abiertos (EBA) en LEC. Prueba realizada administrando vía oral la sappanchalcona 1 aislada del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 1 a 10 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.	57
	* Diferencia significativa (p =0.05) respecto al control (-) vehículo.	
Fig. 22.	Número de veces que el ratón se asoma y alza en dos patas en LEC. Prueba realizada administrando vía oral la sappanchalcona 1 aislada del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 1 a 10 mg/Kg comparado con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.	58
	* Diferencia significativa (p =0.05) respecto al control (-) vehículo.	
Fig. 23.	Número de cruces totales, cruces por el centro y se alza en dos patas en CA. Prueba realizada administrando vía oral el extracto metanólico del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 25 a 200 mg/Kg comparado con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg. * Diferencia significativa (p =0.05) respecto al control (-) vehículo.	59
Fig. 24.	Número de cruces totales, cruces por el centro y se alza en dos patas en CA. Prueba realizada administrando vía oral el extracto acuoso del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 50 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.	60
	* Diferencia significativa (p =0.05) respecto al control (-) vehículo.	
Fig. 25.	Número de cruces totales, cruces por el centro y se alza en dos patas en CA. Prueba realizada administrando vía oral la sappanchalcona 1 (SPC) aislada del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 1 a 10 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.	61
	* Diferencia significativa (p =0.05) respecto al control (-) vehículo.	
Fig. 26.	Sappanchalcona 1 , R= OH; 3-desoxisappanchalcona 2 , R= H	63
Fig. 27.	Correlaciones HMBC (¹³ C, ¹ H), en la sappanchalcona 1 .	64
Fig. 28.	Correlaciones HMBC (¹³ C, ¹ H), en la 3-desoxisappanchalcona 2 .	65
Fig. 29.	Hematoxilol A 3 , R=OH; Tetra acetato de hematoxilol A 3a , R=OAc.	65
Fig. 30.	Correlaciones HMBC (¹³ C, ¹ H), en el Tetra acetato de hematoxilol A 3a .	66
Fig. 31.	4-O-metilhematoxilol 4 , R=OH; Tetra acetato de 4-O-metilhematoxilol A 4a , R=OAc.	67
Fig. 32.	Correlaciones HMBC (¹³ C, ¹ H) del Tetra acetato de 4-O-metilhematoxilol A 4a , R=OAc.	67
Fig. 33.	Hematoxin 5 , R=OH; Diacetato de hematoxin 5a , R=OAc.	68
Fig. 34.	Correlaciones HMBC (¹³ C, ¹ H) del diacetato de hematoxin 5a , R=OAc.	68
Fig. 35.	3,4,7,8-tetra-ol (3R, 4S)-3-(4-hidroxibenzil) chromano 6 (4-hidroxihematoxil).	69
Fig. 36.	Correlaciones HMBC (¹³ C, ¹ H) 4-hidroxihematoxil 6 .	69

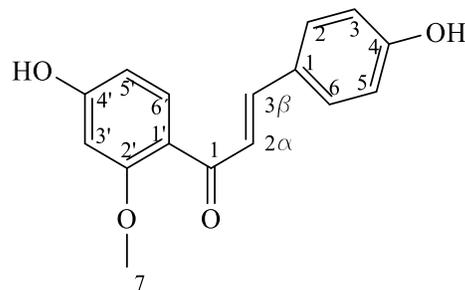
ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA	PÁG.
Tabla 1. Frecuencias de observación para ^1H y ^{13}C .	17
Tabla 2. Concentración efectiva 50 y porcentaje de relajación máxima para los extractos del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> comparados con papaverina (+).	43
Tabla 3. Concentración efectiva 50 y porcentaje de relajación máxima para el extracto y fracciones metanólicas del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> comparados con papaverina (+).	47
Tabla 4. Concentración efectiva 50 y porcentaje de relajación máxima para el extracto acuoso y fracciones del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> comparados con papaverina (+).	48
Tabla 5. Concentración efectiva 50 y porcentaje de relajación máxima para los compuestos aislados del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> comparados con papaverina (+).	50
Tabla 6. Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (TBA) y porcentaje de entradas a los brazos abiertos (EBA) y número de veces que el ratón se asoma y alza en dos patas en LEC. Prueba realizada administrando vía oral el extracto metanólico del tallo (EMT) de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 25 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.	52
Tabla 7. Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (TBA) y porcentaje de entradas a los brazos abiertos (EBA) y número de veces que el ratón se asoma y alza en dos patas en LEC. Prueba realizada administrando vía oral el extracto acuoso del tallo (EEATT) de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 50 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.	54
Tabla 8. Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (TBA) y porcentaje de entradas a los brazos abiertos (EBA) y número de veces que el ratón se asoma y alza en dos patas en LEC. Prueba realizada administrando vía oral la sappanchalcona 1 aislada del tallo (SPC) de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 50 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.	57
Tabla 9. Número de cruces totales, cruces por el centro y número de veces que el ratón se alza en dos patas en CA. Prueba realizada administrando vía oral el extracto metanólico del tallo (EMT) de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 25 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.	59
Tabla 10. Número de cruces totales, cruces por el centro y número de veces que el ratón se alza en dos patas en CA. Prueba realizada administrando vía oral el extracto acuoso del tallo (EEATT) de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 50 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.	60
Tabla 11. Número de cruces totales, cruces por el centro y número de veces que el ratón se alza en dos patas en CA. Prueba realizada administrando vía oral la sappanchalcona 1 (SPC) aislada del tallo de <i>Haematoxylum campechianum</i> para dosis de 50 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.	61
Tabla 12. Desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C de los compuestos aislados de <i>Haematoxylum campechianum</i> . Datos obtenidos a 150 MHz, desplazamientos químicos (δ) expresados en ppm. Los compuestos: 1 , 2 y 6 se disolvieron en CD_3OD y 3a-5a en CDCl_3 , con tetrametilsilano como referencia interna.	71
Tabla 13. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H de los compuestos aislados de <i>Haematoxylum campechianum</i> . Datos obtenidos a 600 MHz, desplazamientos químicos (δ) expresados en ppm, constante de acoplamiento (j) en Hz. Los compuestos: 1 , 2 y 6 se disolvieron en CD_3OD y 3a-5a en CDCl_3 , con tetrametilsilano como referencia interna.	72

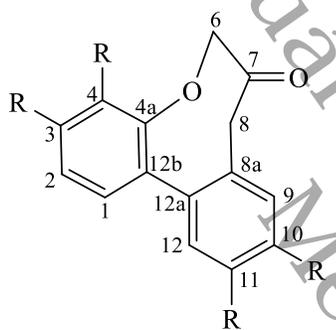
ÍNDICE DE COMPUESTOS.



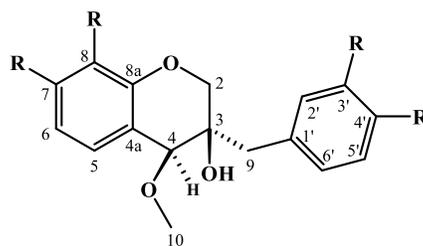
1



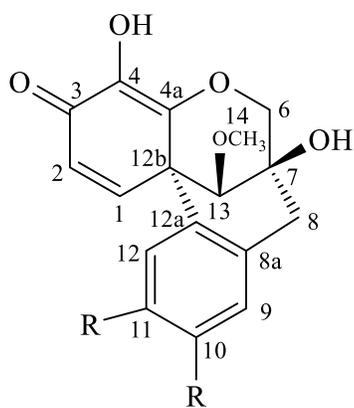
2



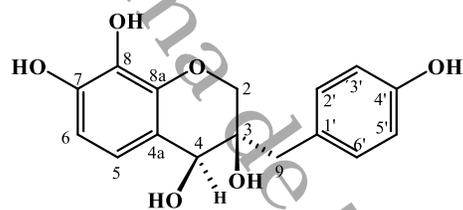
3a



4a

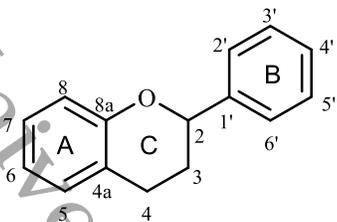


5a

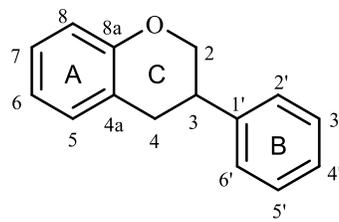


6

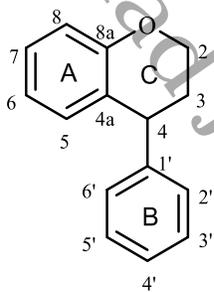
Universidad Juárez Autónoma de México.



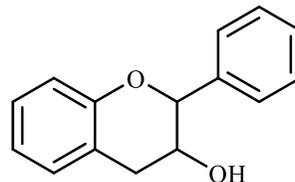
7



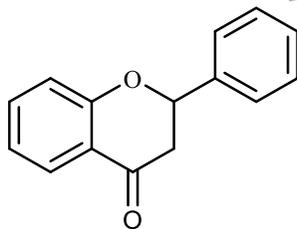
8



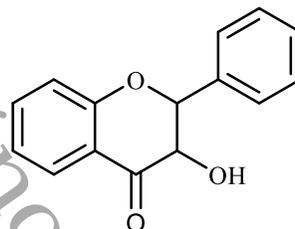
9



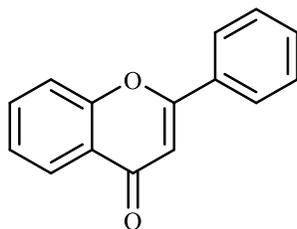
10



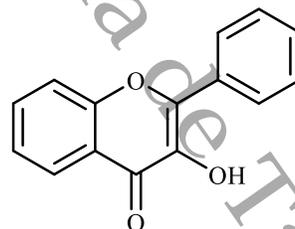
11



12



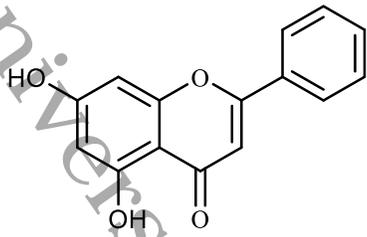
13



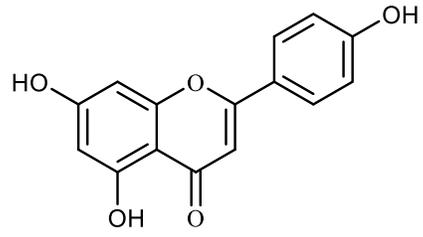
14

de Tabasco.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



15



16

"EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS
CON ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA PRESENTES EN *Haematoxylum campechianum*
(Fabaceae)"

Armando Escobar Ramos.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Cunduacán-Jalpa Km. 0.5, Cunduacán Tabasco, 86690, México.

Centro de Investigación Biomédica del sur, IMSS de Xochitepec, Morelos, 62790, México.

Resumen

Se describe el aislamiento e identificación de seis compuestos bioactivos contenidos en las fracciones metanólica y acuosa de *Haematoxylum campechianum*, dos chalconas conocidas: sappanchalcona **1**, 3-desoxisappanchalcona **2**; tres homoisoflavonoides conocidos: hematoxilol **3**, 4-*O*-metilhematoxilol **4** y hematoxina **5** y un compuesto nuevo, el 4-hidroxiematoxil **6**. Se reportan los datos de RMN, en una y dos dimensiones para los seis compuestos aislados. El extracto metanólico y acuoso, las fracciones y compuestos aislados se sometieron a pruebas biológicas *in vitro*, en íleon aislado de cobayo, estimulado por acción eléctrica; así como a pruebas *in vivo* de ansiedad en laberinto elevado (LEC) y campo abierto (CA).

En la prueba de actividad espasmolítica se determinó que tanto el extracto metanólico como el acuoso tienen actividad relajante del músculo liso, y para una concentración de 400 µg/ml alcanzaron porcentajes de relajación de 85.04±2.4 y 78.34±0.5, respectivamente. En el caso de las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso se observó que, tienen mayor potencia relajante (entre el 70 y 90%) que las fracciones obtenidas del extracto metanólico (entre 24 y 60%), y resultan ser similares al porcentaje de relajación máximo de la papaverina que se usó como control positivo 76.63±5.14. Se encontró que el compuesto **1**, tiene el porcentaje de actividad espasmolítica más bajo de 47.76 ± 9.8, a una concentración de 100 µg/ml.

En las pruebas de ansiedad en LEC se observó que los extractos metanólico y acuoso, incrementaron el tiempo que los sujetos de prueba pasaron en los brazos abiertos. A una dosis de 200 mg/Kg se obtuvo un porcentaje de tiempo máximo en brazos abiertos de 76.32±6.35 y 66.68±20.64 segundos, para el extracto metanólico y acuoso respectivamente, mientras que para la sappanchalcona **1** el porcentaje de tiempo fue de 60.07±14.28 segundos, a una dosis de 10 mg/Kg, similares al porcentaje de tiempo en brazos abiertos cuando se aplicó una dosis de 1 mg/mL de diazepam que se usó como control positivo (74.06±23.42 segundos).

En campo abierto se observó que los extractos metanólico y acuoso, así como la sappanchalcona **1**, ejercen efecto sedante al disminuir la actividad motora espontánea de los animales.

Estos datos indican que *Haematoxylum campechianum* tiene una composición química con efecto ansiolítico y sedante y que la sappanchalcona **1** es la responsable de dicha actividad.

EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF SECONDARY METABOLITES WITH ANSIOLYTIC ACTIVITY PRESENT IN *Haematoxylum campechianum* (Fabaceae)"

Armando Escobar Ramos.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, highway Cunduacán-Jalpa Km. 0.5, Cunduacán Tabasco, 86690, Mexico.

Center for Biomedical Research of the South, IMSS, Xochitepec, Morelos, 62790, Mexico.

Abstract

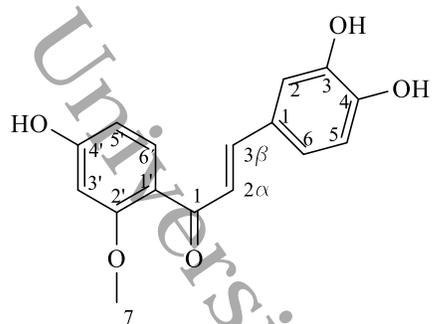
This thesis describes the isolation and identification of six bioactive compounds contained in the methanolic and aqueous fractions of *Haematoxylum campechianum*, two known chalcones: sappanchalcone **1**, 3-deoxysappanchalcone **2**; three known homoisoflavonoids: hematoxylol **3**, 4-O-methylhematoxylol **4** and hematoxyn **5** and a new compound 4-hydroxyhematoxyl **6**. The NMR data are reported in one and two dimensions for the six isolated compounds. The methanolic and aqueous extracts, the chromatographic fractions and isolated compounds were subjected to biological tests *in vitro*, in isolated ileum of guinea pig stimulated by electrical action; as well as *in vivo* anxiety tests in rats employing both the elevated plus-maze (EPM) and the open field (OF).

In the case of the spasmolytic activity, it was determined that both the methanolic and aqueous extracts have smooth muscle relaxant activity, at a concentration of 400 $\mu\text{g} / \text{ml}$ they achieved relaxation percentages of 85.04 ± 2.4 and 78.34 ± 0.5 , respectively. For the fractions obtained from the aqueous extract, it was observed a greater relaxing power (between 70 and 90%) when compared with the fractions obtained from the methanolic extract (between 24 and 60%), and they were similar to the percentage of maximum relaxation of papaverine that was used as a positive control (76.63 ± 5.14). It was found that compound **1** has the lowest percentage of spasmolytic activity of 47.76 ± 9.8 , at a concentration of 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

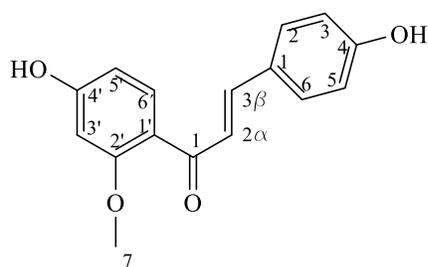
For the anxiety tests in EPM, it was observed that both the methanolic and aqueous extracts, increased the time that the test subjects spent in the open arms. At a dose of 200 mg / kg , a maximum time percentage in open arms of 76.32 ± 6.35 and 66.68 ± 20.64 seconds, were obtained for methanolic and aqueous extract respectively, while for sappanchalcone **1** the percentage of time was 60.07 ± 14.28 seconds, at a dose of 10 mg / kg , this result was similar to the percentage of time in open arms (74.06 ± 23.42 seconds) when a dose of 1 mg / mL of diazepam (positive control) was applied.

In the open field experiments, it was observed that both the methanolic and aqueous extracts, as well as sappanchalcone **1**, exert a sedative effect by decreasing the spontaneous motor activity of the animals.

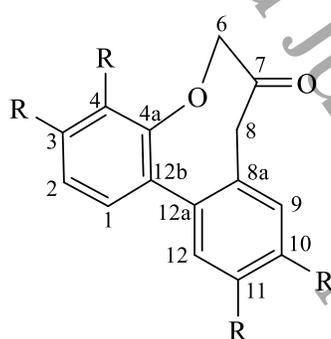
These data indicate that *Haematoxylum campechianum* has a chemical composition with anxiolytic and sedative effect and that sappanchalcone **1** is responsible for this activity.



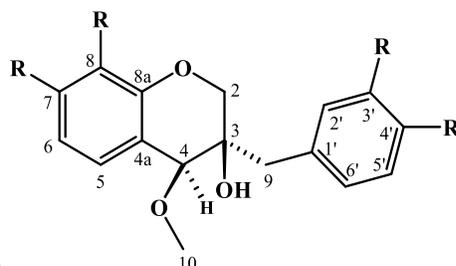
Sappanchalcona **1**



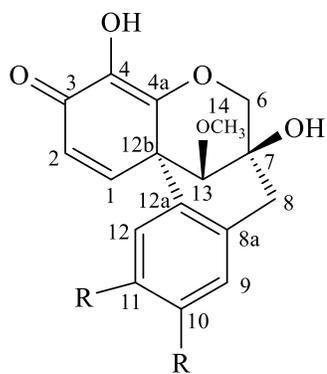
3-desoxisappanchalcona **2**



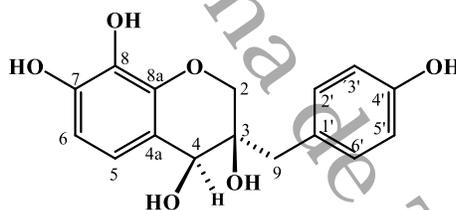
Tetra acetato de hematoxilol A **3a**



Tetra acetato de 4-O-metilhematoxilol **4a**



Diacetato de hematoxina **5a**



4-hidroxihematoxilol **6**

Fig.1 Estructura molecular de los compuestos aislados de *Haematoxylum campechianum*.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

CAPÍTULO I
ANTECEDENTES

I. ANTECEDENTES

1.1 Uso de las plantas medicinales.

El estudio moderno de las plantas medicinales se ha diversificado de manera abrumadora en los últimos 20 años. Estudios moleculares, identificación química de principios activos y desarrollo biotecnológico de fitofármacos son sólo algunos de los campos actuales del conocimiento científico sobre plantas medicinales. A nivel mundial, es hasta la década de los 70's del siglo pasado en donde se retoma y se da relevancia al uso de plantas medicinales como una alternativa para el tratamiento de enfermedades, esta manera de utilizar las plantas se conoce como "medicina tradicional" (Parra, H., *et al.*, 2015). Existe en la literatura un número considerable de reportes acerca de extractos o de compuestos aislados de especies vegetales en todo el mundo, acerca de su efectividad antiinflamatoria y ansiolítica; convirtiéndose en un excelente recurso por explorar experimentalmente en la búsqueda de moléculas o sustancias efectivas para combatir estos padecimientos (Zhang, Z., 2004).

En México, el uso de las plantas medicinales data de épocas ancestrales, es un país muy vasto en biodiversidad y geográficamente privilegiado por la variedad de climas y diversidad de composición de los suelos. La flora es de las más ricas del planeta, a tal grado que podría ser una fuente de riqueza de nuevas sustancias bioactivas. Se tienen catalogadas aproximadamente 3,000 especies medicinales, pero en uso común solamente hay 300 (Mata, R., *et al.*, 1999, Parra, H., *et al.*, 2015).

Por su ubicación geográfica, el estado de Tabasco ostenta una flora muy variada, predominando las plantas para uso medicinal, las cuales se conocen desde épocas prehispánicas por diferentes culturas indígenas que a través de la observación y la perseverancia que se mantuvo por varias generaciones, adquirió el conocimiento necesario para determinar la capacidad curativa de estas plantas. Esta experiencia se acrecentó por la interacción con la cultura europea durante el proceso de colonización; conformándose lo que actualmente se conoce como medicina tradicional, la cual ha perdurado en el tiempo y ha jugado una labor importante como una alternativa viable social y económica para tratar de resolver los problemas de salud más habituales que se presentan en los trópicos del mundo (Maldonado, F., 2005).

1.2 Problemas de salud mental por depresión y ansiedad en el mundo.

Los trastornos por depresión y por ansiedad son problemas usuales de salud mental que perjudican la capacidad de trabajo y la productividad. Más de 300 millones (4.4%) de personas en el mundo sufren

depresión, un trastorno que es la principal causa de discapacidad, y más de 260 millones (3.8%) tienen trastornos de ansiedad. De hecho, muchas personas padecen ambas afecciones (OMS, 2017).

Las enfermedades psiquiátricas comúnmente se asocian con el suicidio. En el mundo se reportan entre 10 y 20 millones de intentos de suicidio cada año, de los cuales, un millón termina en el fallecimiento de la persona. La depresión es el trastorno mental más recurrente. Se caracteriza por apatía, pérdida de energía, insomnio, retraso del pensamiento y de las actividades físicas, así como sentimientos de tristeza profunda, desesperanza y pensamiento suicida. La función de la ansiedad en la conducta suicida no ha sido explicado completamente, los estudios de seguimiento en poblaciones clínicas sostiene que del 15 al 20% de los decesos de los pacientes con ansiedad se deben a suicidio (Baca, E., Aroca F., 2014). El trastorno de ansiedad generalizada, se caracteriza por la presencia de una preocupación excesiva, permanente e incontrolable (sin que exista una amenaza real), que se vincula con diversos aspectos de la vida como tensión muscular, hiperactividad autonómica, agotamiento, dificultad para concentrarse, dolor de cabeza, molestias gastrointestinales, mareos y temblores. Las alteraciones cognitivas primarias, asociadas a manifestaciones somáticas secundarias de la ansiedad, alteran la capacidad de trabajo, las relaciones interpersonales y las actividades placenteras (Marian, L. P., *et al.*, 2014; López de la Parra, M., *et al.*, 2014).

1.3 Depresión y ansiedad en México.

En México este problema de salud contempla aproximadamente 15 millones de víctimas, representando el 14.5% de la población total del país; frecuentemente este trastorno está asociado con depresión y con trastornos neuróticos (INEGI, 2010, Camuñas, N., *et al.*, 1999; Medina-Mora, *et al.*, 2003). Las estadísticas reportan que en 2007 se observaron 4388 suicidios en ambos sexos. Como causas se identificaron la ansiedad, depresión, estrés, soledad, desesperanza, exigencia social y sentimientos de rechazo. En México los padecimientos de ansiedad afectan el 7.7% de las mexicanas y 3.6% de los mexicanos (OMS, 2017; Espinoza, M., *et al.*, 2015).

En este trabajo, se estudió la especie *Haematoxylum campechianum*, la cual se ha seleccionado por ser un árbol que está ampliamente distribuido en el Estado de Tabasco, lo que representa un recurso natural disponible, y por los efectos que sus metabolitos secundarios ejercen sobre el sistema nervioso central.

1.4 Material Vegetal.

Se utilizó el duramen de *Haematoxylum campechianum* (Fabaceae). El material vegetal se colectó en Cunduacán, Tabasco, y se preparó un espécimen para su identificación por un taxónomo.

El género *Haematoxylon* (Leguminosae) tiene dos especies: *Haematoxylum campechianum* y *Haematoxylum brassileto*, ambos son árboles nativos de América Central y pertenecen a la familia de las Fabaceae y la subfamilia Caesalpinioideae (Yasunaka, K., *et al.*, 2005). El *H. campechianum* en México se conoce como "madera roja", "madera negra" y "madera de Campeche" porque originalmente fue encontrada en las costas del Golfo de México, en el estado de Campeche (Durán, R., Méndez, M., 2010).

El "Campeche" o "palo de tinto" (*Haematoxylum campechianum*) es un árbol que alcanza una altura de 10 a 15 metros, y un diámetro de 45 a 80 cm. Se distribuye naturalmente al sur de México, América Central, Colombia, Venezuela y las Guayanas, además, es común en algunas áreas de la República Dominicana y de la República de Haití, y en Cuba. Crece bien en suelos pantanosos y puede formar matorrales. (Norton, S., 1996; Castillo, E., *et al.*, 2011). Es un árbol espinoso, perennifolio, fuste acanalado, nudoso y retorcido. Posee copa redondeada con las ramas ascendentes y torcidas (fig. 5). La corteza es de color pardo grisáceo o de color pardo amarillento, escamosa, dividida en piezas pequeñas y cuadradas o longitudinales, con un grosor entre 2 y 8 cm. Hojas compuestas dispuestas en espiral de 3 a 10 cm de largo con tres a cuatro pares foliolos sésiles de 1 a 3 cm de largo y de 0.8 a 1.8 cm de ancho, cuneiforme, con el margen entero, ápice truncado a emarginado; has verde limón y brillante, envés verde pálido. Inflorescencias en racimos axilares y terminales de hasta 10 cm de largo; flores de 5 a 7 mm de largo, zigomórficas, cáliz con 5 sépalos pardo rojizo, desiguales elípticos, corolas con 5 pétalos, el mayor de 7 mm de largo, 10 estambres amarillos de 7 mm de largo. El fruto es una vaina aplanada de 3 a 6 cm de largo y de 6 a 15 mm de ancho, pardo amarillenta, membranosa, conteniendo de una a dos semillas (Maldonado, F., 2005).

1.5 Usos tradicionales de *Haematoxylum campechianum*.

En la península de Yucatán los mayas prehispánicos utilizaban el palo de tinto para pintarse de negro el rostro y el cuerpo para sus rituales. Asimismo, lo empleaban para pintar los hilos con que trenzaban sus cabellos y para teñir algunas ropas de vestir.

El palo de tinto posee una gran cantidad de hematoxilina, que al contacto con el aire, el sol y la humedad, sufre un proceso de oxidación que la convierte en hemateína que se transforma en materia colorante.

El palo de tinto, al igual que otras tintóreas como el añil, el palo de Brasil y el chukum, se comercializaba entre los indígenas mucho antes de la presencia española en América. La desaparición de los colorantes naturales, que algunos autores ubican en los años posteriores a 1856, se debió a la aplicación de taninos sintéticos que empezaban a circular en los mercados europeos. En la segunda mitad del siglo XIX la aplicación de algunos tintes basados en anilinas dio el golpe de gracia a la producción de granas en algunas regiones (Durán, R., Méndez, M., 2010).

El nombre del árbol significa "madera que sangra", el corazón (centro de la madera) de este árbol es una fuente importante para la obtención de un tinte conocido como hematoxilina que se utiliza como tinción en la histología (Norton, S., 1996; Mazzuco, G., *et al.*, 1982; Waldeyer, W., 1863); También, el extracto de la madera se ha utilizado como edulcorante (Masuda, H., *et al.*, 1991). El duramen se ha utilizado en medicina tradicional para el tratamiento de la depresión, trastornos renales, problemas cardíacos, dolor de dientes, fiebre, diarrea, hemorroides (Maldonado, F., 2005; Martínez, M., 2005), y las ramas se utilizan principalmente para remover toxinas de la sangre (Gómez-Méndez, E., *et al.*, 2004). Se aplica partiendo en pedazos la parte roja del tallo, y se coloca en agua, cuando ésta toma un color rojizo, se toma como agua de uso. La corteza se puede hervir en agua y se toma como té (Maldonado, F., 2005).

1.6 Estudios químicos realizados a *Haematoxylum campechianum*.

Los estudios químicos realizados a esta planta permitieron aislar e identificar: la hematoxilina, que al oxidarse produce hemateína, y la brasilina (Perkin, W., *et al.*, 1907; Namikoshi, M., *et al.*, 1987), esta última también se aisló de *Caesalpinia echinata* (Leguminosae), el hematoxilol A (**3**) (Masuda, H., *et al.*, 1991), protosappanina A y B, sappanchalcona (**1**) y 3-desoxisappanchalcona (**2**) que también fueron aislados de *Caesalpinia sappan* L., tetra-*O*-metilhematoxilol B, trimetiléter de protosappanina B (Masuda, H., *et al.*, 1991; Masahiro, N., *et al.*, 1986).

En 2008 Lin-Gen L., realizó pruebas para determinar la inhibición de la tirosina quinasa, proteínas que juegan un papel crucial en la transducción de señales que regulan una variedad de funciones, tales como diferenciación, proliferación y apoptosis. La actividad descontrolada de estas quinasas conduce a un crecimiento, control y transformación celular anormal, que son características de malignidad.

Los siguientes compuestos aislados de *Haematoxylum campechianum*, mostraron actividad para inhibir la acción descontrolada de dichas proteínas: hematoxilol, epihematoxilol, 4-*O*-metilhematoxilol (**4**),

4-*O*-metilepihematoxilol, sappaneno, hematoxileno, hematoxilona, hematoxina (**5**), epihematoxina, isohematoxilina, hematoxilina, sappanona B, sappanol, 4-*O*-metilsappanol, 3'-desoxi-*O*-metilsappanol, 3'-desoxisappanona A, sappanona A, bonducellina, (E)-eucomina, buteina, sappanchalcona **1**, isoliquiriteginina, 3'-desoxisappanchalcona, isobavachalcona, protosappanina A y hematoxilol A (**3**). Los resultados demostraron que la hematoxilina, el hematoxilol A (**3**), hematoxilona y el epihematoxilol B, son los compuestos más activos y tienen potencial para ser empleados en la quimioprevención del cáncer (Lin-Gen, L., *et al.*, 2008; Lin-Gen, L., *et al.*, 2014; Ming-Bo Z., *et al.*, 2014).

La sappanchalcona **1** mostró efecto antiinflamatorio y protector del hueso, al ser probado en un modelo de artritis reumatoide en ratones. La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune que afecta principalmente a las articulaciones sinoviales más pequeñas, genera hinchazón dolorosa que puede conducir a la erosión ósea y deformidad. La incidencia de este trastorno es alta y está asociada con dolor, deformidad y reduce la capacidad de trabajo. (Eui Gil, J., *et al.*, 2015).

Hasta ahora, sólo hay informes de actividad biológica en los compuestos, pero no para extractos y fracciones de duramen de *Haematoxylum campechianum*. No se encontraron reportes de pruebas de ansiedad para extractos y compuestos derivados de este árbol.

1.7 Disolventes polares y no polares.

Los disolventes polares, son compuestos en cuyas moléculas la distribución de la nube electrónica es asimétrica; por lo tanto, la molécula exhibe polos con carga positiva y negativa, separados por una cierta distancia, lo que constituye un dipolo permanente. El ejemplo clásico de disolvente polar es el agua. Los alcoholes de baja masa molecular también pertenecen a este tipo de solventes. Los disolventes polares se pueden subdividir en: próticos y apróticos. Un disolvente polar prótico contiene enlaces O-H o N-H, como agua, etanol y ácido acético, entre otros. Un disolvente polar aprótico es un disolvente polar que no contiene enlaces O-H o N-H, ejemplo de ellos son la acetona, DMSO, etc. Los disolventes apolares, en general son sustancias de tipo orgánico y en cuyas moléculas la distribución de la nube electrónica es simétrica; por tanto, estas sustancias carecen de polo positivo y negativo en sus moléculas. No pueden considerarse dipolos permanentes. Sin embargo algunos de sus enlaces pueden ser polares. Todo dependerá de la geometría molecular. Si los momentos dipolares individuales de sus enlaces están compensados, la molécula será, en conjunto, apolar (Weininger, S., J. 1988).

La polaridad de un disolvente se puede determinar por el valor de su constante dieléctrica (ξ), que es la capacidad relativa de un disolvente para interferir con la atracción entre cargas de signo opuesto. Los

disolventes muy polares con constante dieléctrica elevada son capaces de disolver (solvatar) las sales, ya que facilitan la separación de los iones positivos y negativos. Como punto de referencia se considera que un disolvente es polar cuando el valor de su constante dieléctrica es superior a 15 (Weininger, S., J. 1988).

1.8 Íleon de Cobayo.

El íleon es la porción distal del intestino delgado. Está constituido por la serosa; dos capas de músculo liso, una capa longitudinal externa y una circular interna; dos plexos nerviosos; la submucosa; la mucosa muscularis; y, la mucosa, que contiene las vellosidades. Las contracciones del músculo liso circular (contracciones segmentales) mezclan el contenido del lumen; y las contracciones del músculo longitudinal producen las contracciones peristálticas que se superponen a las de segmentación e impulsan el quimo a lo largo del intestino. Un plexo nervioso es una red de nervios que se encuentra entre los tejidos. En el intestino existen dos plexos nerviosos: el de Auerbach y el de Meissner. La estimulación eléctrica del íleon activa las fibras nerviosas de ambos plexos.

La noradrenalina o norepinefrina es el principal neurotransmisor inhibitorio y al ser liberado desde las fibras simpáticas postganglionares, actúa sobre los adrenoreceptores inhibitorios en la membrana del músculo liso produciendo relajación. La acetilcolina es el principal neurotransmisor excitatorio de la sinapsis ganglionar y es liberada desde las fibras parasimpáticas postganglionares. Actúa sobre los receptores colinérgicos nicotínicos de las neuronas entéricas y los muscarínicos del músculo liso produciendo contracción. Cuando se agrega a la preparación del íleon acetilcolina o cualquier otro agonista que interactúe directamente con los receptores localizados en la membrana del músculo liso se produce una contracción inmediata inducida por el aumento transitorio de la concentración de calcio intracelular; mientras que, como ya se mencionó, la adición de noradrenalina a la preparación produce relajación (Dewhurst, D., *et al.*, 2010).

1.9 Flavonoides

Los flavonoides son sustancias de bajo peso molecular producidos por plantas vasculares. Han estado presentes en la naturaleza durante millones de años. El hombre los consume en la dieta, ya que están presentes de forma abundante en los vegetales, en frutas rojas como fresas, zarzamoras, frutas cítricas, chocolate, nueces, vino tinto y en varias plantas medicinales. Estos compuestos poseen una amplia gama de actividades farmacológicas entre las que destacan sus propiedades antioxidantes, las cuales les

confieren capacidad de proteger a las células del estrés oxidativo relacionado con patologías asociadas al envejecimiento, como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. En los últimos 30 años se ha realizado una intensa investigación sobre sus acciones en el SNC, entre las que sobresalen sus propiedades como ansiolíticos, sedantes, antidepresivos y anticonvulsivos. Se ha demostrado que estos efectos son mediados principalmente por los receptores GABA, en particular los receptores GABA_A, por lo que, los flavonoides han sido reconocidos como una nueva familia de benzodiazepinas, con la ventaja de no presentar los efectos colaterales que éstas producen (Estrada-Reyes, R., 2012).

En las plantas, algunos flavonoides confieren resistencia contra la fotooxidación producida por la luz ultravioleta del sol, intervienen en el transporte de hormonas y algunos funcionan como defensa ante los depredadores. Desde el siglo pasado es bien conocida la relación que existe entre la presencia de flavonoides en las plantas y su resistencia a las infecciones fúngicas y virales. Otra de sus importantes funciones en muchas plantas es la atracción de los insectos polinizadores por medio del color o del olor que les confieren a éstas o a sus flores asegurando así su reproducción y conservación.

Aunque numerosos estudios han descrito los efectos de diversos flavonoides en el SNC, es escasa la información de cómo permean la barrera hematoencefálica (BHE). Investigaciones recientes *in vitro* e *in vivo* indican que tanto los flavonoides hidrolizados (agliconas) como sus productos de conjugación son capaces de atravesar la BHE. Algunas investigaciones indican que flavonoides glicosilados como el 3-β-rutinósido de cianidina y el glucósido de pelargonina, así como las flavanonas (agliconas) hesperetina, naringenina y sus productos de conjugación atraviesan la BHE. Por lo que al parecer, la capacidad de los flavonoides de permear la BHE no sólo depende de su lipofiliidad sino también de su capacidad de conjugación; metabolitos que son conjugados por metilación en el intestino delgado y en el hígado, al ser más lipofílicos, pueden permear la BHE con mayor facilidad que sus agliconas de origen (Estrada-Reyes, R., 2012).

De forma coloquial se tiende a generalizar cuando se habla de “los flavonoides” y sus beneficios en la salud, sin embargo esta familia se caracteriza por su diversidad estructural de tal manera que se han identificado más de 6000 de estos metabolitos secundarios cuyas propiedades biológicas dependen en gran medida de su estructura particular, es decir del tipo de sustituyentes, grupos funcionales, grado de oxidación, formas diméricas, poliméricas, formas glicosiladas o libres, entre otras. El término flavonoide es generalmente utilizado para describir una amplia gama de productos naturales con un sistema C6-C3-C6 (anillos A, C y B) o más específicamente con una funcionalidad fenilbenzopirano,

benzo- γ -pirona o cromano, consistente en un anillo fenólico y un anillo pirano y son clasificados de acuerdo a su sustitución.

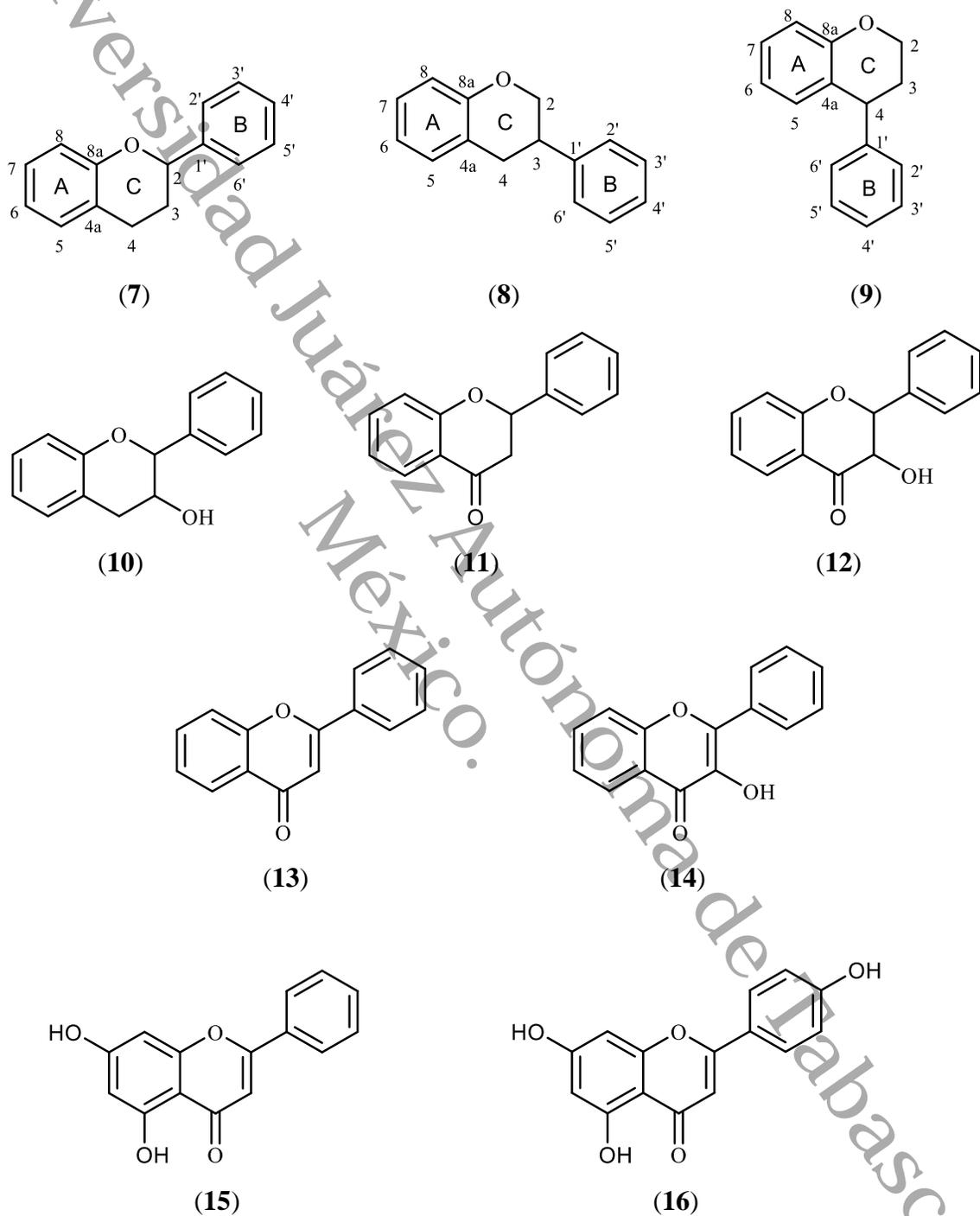


Fig. 2. Estructura de flavanos: flavonoide 7, isoflavonoide 8, neoflavonoide 9; flavanol 10, flavanona 11, flavanona 12, flavona 13, flavonol 14, crisina 15 y apigenina 16.

Los flavonoides (Fig. 2) se dividen inicialmente en tres clases, dependiendo del sitio de unión del anillo B con el benzopirano (A): los flavonoides I (2-fenilbenzopiranos **7**), isoflavonoides II (3-fenilbenzopiranos **8**) y los neoflavonoides III (4-fenilbenzopiranos **9**).

Por otro lado, a partir de los años 1960 los fármacos ansiolíticos más utilizados en la práctica clínica han sido los de la familia de las benzodiazepinas (BZD), utilizados también para el tratamiento de la epilepsia, el insomnio, ciertos estados depresivos, algunos estados afectivos, etcétera. Las benzodiazepinas ejercen su acción por su interacción con los receptores GABAérgicos tipo A. Estos receptores son proteínas transmembranales con un ensamble hetero-oligomérico constituidas por varias subunidades, que conforman un canal iónico permeable al ion cloruro (Cl⁻) y cuyo ligando es el ácido gama amino butírico (GABA). Cuando el GABA se une al receptor el canal iónico se abre permitiendo el flujo del ion cloruro el cual produce la hiperpolarización de la membrana de la neurona receptora y la inhibición de la transmisión de los impulsos nerviosos, produciendo efectos tranquilizantes, sedantes o ansiolíticos (Estrada-Reyes, R., 2012).

En 1983, el grupo de Medina, Paladini y colaboradores investigaron los principios activos de plantas con propiedades sedantes. Realizaron estudios de unión a receptores de BZD con la esperanza de encontrar principios activos con estructuras similares a las benzodiazepinas. Como resultado de este estudio demostraron por primera vez que las flavonas: crisina y apigenina que aislaron de la pasiflora (*Passiflora coerulea*), y de la manzanilla (*Matricaria rucutita*); y el núcleo flavona en sí mismo, poseen propiedades ansiolíticas en modelos de conducta en ratones. En modelos in vitro estos metabolitos secundarios mostraron alta y mediana afinidad por el sitio de unión a BZD. Estas flavonas presentaron además escasa actividad sedante y miorelajante, lo cual representó la primera ventaja de estos metabolitos sobre las BZD y mostró su potencial como fármacos para uso humano (Estrada-Reyes, R., 2012).

Paladini y colaboradores hicieron modificaciones químicas de las flavonas ansiolíticas naturales y obtuvieron derivados con mejores propiedades, de los cuales la 6,3'-dinitroflavona mostró una afinidad por los receptores cerebrales específicos, comparable a la de las BZD, pero con una actividad 10 veces superior. También realizaron un estudio análogo al descrito con las valerianas, plantas de uso milenario en la medicina tradicional por sus propiedades tranquilizantes e inductoras del sueño. Esta investigación permitió descubrir en sus extractos la presencia del flavonoide 6-metilapigenina, que resultó ser un ligando para el receptor GABA_A con propiedades ansiolíticas pero no sedantes, ni hipnóticas. Como

resultado de estas intensas investigaciones los flavonoides han sido postulados como “una nueva familia de ligandos con sitios de afinidad específicos en los receptores GABA” (Estrada-Reyes, R., 2012).

1.10 Cromatografía líquida de alta resolución.

Es la forma de cromatografía por elución más versátil y más utilizada. La técnica es útil para separar y determinar especies en una variedad de materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos. En la cromatografía líquida, la fase móvil es un disolvente líquido que contiene a la muestra en la forma de una mezcla de solutos. La cromatografía de líquidos se puede llevar a cabo en columnas de vidrio con diámetros interiores entre 10 y 50 mm, empacadas con partículas sólidas con longitud entre 50 a 500 μm , la cual se cubre con un líquido adsorbido, que forma la fase estacionaria. Para asegurar velocidades de flujo razonables a través de esta fase el tamaño de partícula del sólido se mantiene entre 150 y 200 μm . Para acelerar las velocidades de flujo se utiliza vacío o presión, sin embargo este procedimiento incrementa la altura de plato y disminuye la eficiencia de la columna. Se puede conseguir una disminución de la altura de plato si el tamaño de partícula es más pequeño (Skoog, D. A., 2015).

No fue sino hasta finales de la década de los 1960 que se desarrolló la tecnología para producir y usar empacamientos con diámetros de partículas entre 3 a 10 μm . Esta tecnología requería de instrumentos capaces de bombear presiones mucho más altas que los dispositivos simples que les precedieron. De manera simultánea se desarrollaron detectores para el monitoreo continuo de los efluentes de la columna. El nombre cromatografía líquida de alta resolución CLAR (HPLC, por sus siglas en inglés) suele emplearse para diferenciar esta tecnología de los procedimientos cromatográficos en columna simple. Una elución con un solo disolvente o una mezcla de disolventes de composición constante se denomina elución isocrática. En la elución en gradiente, se utilizan dos (y a veces más) sistemas de disolventes que difieren de manera significativa en polaridad y cuya composición es variada durante la separación. La elución en gradiente suele mejorar la eficiencia de separación (Skoog, D. A., 2015).

Los primeros trabajos sobre cromatografía líquida se basaban en fases estacionarias altamente polares, mientras que un disolvente relativamente no polar, servía como fase móvil. Por razones históricas, este tipo de cromatografía se conoce ahora como cromatografía en fase normal. En la cromatografía en fase reversa, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es un disolvente relativamente polar. En la cromatografía en fase normal el componente menos polar eluye primero; aumentar la polaridad de la fase móvil disminuye el tiempo de elución. En contraste, en la cromatografía en fase reversa el

componente más polar es el que eluye primero, y al aumentar la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución (Skoog, D. A., 2015).

1.11 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una de las herramientas más poderosas disponible para la determinación de estructuras orgánicas. Al igual que la espectroscopía infrarroja, la RMN se puede usar con una muestra muy pequeña sin que la muestra se modifique. El espectro de RMN proporciona una gran cantidad de información sobre la estructura del compuesto, y muchas estructuras pueden ser determinadas usando solo el espectro de RMN. Sin embargo, la espectroscopía de RMN se usa junto con otras formas de espectroscopía y análisis químico para determinar las estructuras de moléculas orgánicas complicadas. La RMN es utilizada para estudiar una amplia variedad de núcleos, incluyendo ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F y ^{31}P . Los químicos orgánicos encontraron que el protón (^1H) y el carbono 13 (^{13}C) son los más útiles porque el hidrógeno y el carbono son los principales componentes de los compuestos orgánicos. Históricamente, la RMN se usó por primera vez para estudiar protones (los núcleos de átomos de hidrógeno) y los espectrómetros de resonancia magnética de protón, han sido los más comunes. "Resonancia magnética nuclear" se supone que significa "resonancia magnética de protones" a menos que se especifique otro núcleo (Wade, L. G., 2013; Carey, F. A., *et al.*, 2011).

Un núcleo con un número atómico impar o un número de masa impar tiene un giro nuclear que puede ser detectado por el espectrómetro de RMN. Un protón es el núcleo más simple, y su número atómico impar de uno implica que tiene un giro. Podemos visualizar un protón giratorio como la rotación de una esfera de carga positiva. Este movimiento de carga es como una corriente eléctrica en un bucle de alambre. Genera un campo magnético, llamado momento magnético, que se parece al campo de un pequeño imán de barra. Cuando se coloca un pequeño imán de barra en el campo de un imán más grande, gira para alinearse con el campo del imán más grande: un arreglo de más baja energía que una orientación contra el campo. El mismo efecto se ve cuando un protón se coloca en un campo magnético externo (B_0).

En ausencia de un campo magnético externo, los momentos magnéticos del protón tienen orientaciones aleatorias. Cuando se aplica un campo magnético externo, cada protón en una muestra asume el estado α -spin (estado de baja energía) o el estado β -spin (estado de alta energía). Como el estado de α -spin es más bajo en energía, hay más α -giros que β -giros (Wade, L. G., 2013; Carey, F. A., *et al.*, 2011).

En un campo magnético fuerte, la diferencia de energía entre los dos estados de giro es más grande que en un campo más débil. De hecho, la diferencia de energía es proporcional a la fuerza del campo magnético, como se expresa en la ecuación:

$$\Delta E = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0$$

ΔE = Diferencia de energía entre los estados α y β .

h = Constante de Plank.

B_0 = Fuerza del campo magnético externo.

γ = Relación giromagnética 267.512×10^6 y 67.2640×10^6 rad $\text{seg}^{-1} \text{T}^{-1}$ para ^1H y ^{13}C , respectivamente.

La relación giromagnética es una constante que depende del momento magnético del núcleo en estudio. Los campos magnéticos se miden en gauss; por ejemplo, la fuerza del campo magnético de la tierra es de aproximadamente 0,57 gauss. La unidad SI para campo magnético es tesla (T), que es simplemente 10,000 gauss. La diferencia de energía entre los dos estados de giro de un protón es pequeña. Para un campo magnético externo fuerte es de 25,000 gauss (2.5 T), es solo alrededor de 10 a 5 kcal/mol Incluso esta pequeña diferencia de energía puede detectarse mediante RMN. Cuando un protón interactúa con un fotón con la cantidad justa de energía electromagnética, el giro del protón puede voltearse desde α a β o desde β a α . Un núcleo alineado con el campo puede absorber la energía necesaria para voltearse y alinearse contra el campo. Cuando un núcleo está sujeto a la combinación correcta de campo magnético y radiación electromagnética para voltear su giro, se dice que está "en resonancia", y su absorción de energía es detectada por el espectrómetro de RMN (Tabla 1). Este es el origen del término "resonancia magnética nuclear" (Wade, L. G., 2013; Carey, F. A., *et al.*, 2011).

Tabla 1. Frecuencias de observación para ^1H y ^{13}C .

B_0 (Tesla)	ν ^1H (MHz)	ν ^{13}C (MHz)
1.4093	60	15.087
2.1139	90	22.629
2.3488	100	25.144
4.6975	200	50.288
9.3950	400	100.577
11.7440	500	125.720
14.0928	600	150.864
17.6160	750	188.580

1.11.1 Técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) utilizadas.

RMN de ^1H .

Con el incremento de la disponibilidad de magnetos superconductores, la espectroscopia de RMN de campos fuertes se ha hecho una realidad. Los campos magnéticos fuertes proporcionan las siguientes ventajas: 1) incremento en la sensibilidad de la señal; 2) Mejoría en la separación de las señales; y 3) Se alcanza un patrón de división de primer orden (incrementa la simetría de los patrones), lo cual facilita la interpretación. Además de una mayor separación en resonancia con campos fuertes, la superposición de señales se reduce aún más por el hecho de que las constantes de acoplamiento (j) son independientes en campos magnéticos fuertes. Por lo tanto, un multiplete ocupará relativamente menos ancho espectral a mayor campo. Con instrumentos a campos bajos, la separación de las señales se puede mejorar con un cambio de disolvente. La información que proporciona un espectro de RMN de ^1H es la siguiente:

Número de señales: Determina cuántos tipos diferentes de hidrógeno existen en una molécula.

Desplazamiento químico (δ): Nos da una idea del ambiente químico que rodea a cada tipo de hidrógeno. Comprende una escala de 0 a 12 ppm.

Multiplicidad: Nos indica cuantos hidrógenos son vecinos a cada tipo de hidrógeno.

Integración: Calcula cuántos hidrógenos de cada tipo existen en la molécula.

Intercambio por deuterio: Señala cuáles hidrógenos están unidos a heteroátomos como O, N, etc., (García-Barradas, O., 2016; Carey, F. A., *et al.*, 2011).

RMN de ^{13}C .

Un procedimiento estándar para RMN de ^{13}C consiste en irradiar toda la región de protón (0 a 12 ppm) usando la técnica de desacoplamiento de ruido. Cuando el acoplamiento de ^1H y ^{13}C desaparece, todas las señales de ^{13}C se convierten en singuletes. Al mismo tiempo, como resultado del NOE cuando los protones son irradiados, el tamaño de la señal de ^{13}C aumenta casi por tres veces. Sin embargo, en este procedimiento se pierde completamente el acoplamiento ^{13}C , ^1H , y no se puede determinar el número de átomos de hidrógeno adyacentes a los carbonos. La única información de interés en el espectro de ^{13}C es el desplazamiento químico que tiene una escala de 0 a 210 ppm. La altura de la señal no es proporcional al número de carbonos. La señal de los carbonos en disolventes deuterados, cuando el número de deuterios (D) sobre el carbón es n, se divide en (2n+1). Las señales de los carbonos para CDCl_3 se observa como un triplete y para CD_3OD aparece como un septeto (Nakanishi, K., 1990; Carey, F. A., *et al.*, 2011).

Espectro DEPT.

El espectro DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*, incremento sin distorsión por transferencia de polarización) utiliza una secuencia de pulsos cortos que durante el tiempo de evolución del experimento, ocasiona que la pérdida de magnetización debido a la relajación transversal no sea tan severa. Además DEPT es menos sensible a las distorsiones debidas a factores tales como pulsos anchos. El llamado espectro editado nos permite preparar espectros DEPT de tal manera que solo las señales de CH, CH_2 , o CH_3 sean desplegadas. Para un pulso de 45° , todas las señales de los carbonos excepto los cuaternarios están sobre el lado positivo, para pulsos de 90° solo las señales de CH están en el lado positivo y para pulso de 135° CH y CH_3 están en el lado positivo, mientras que las señales de CH_2 se encuentran hacia el lado negativo (Nakanishi, K., 1990; Carey, F. A., *et al.*, 2011).

Espectro H-H-COSY.

La espectroscopía de correlación homonuclear es la técnica usada más frecuentemente en 2D-TF RMN. En el espectro COSY (*Correlation Spectroscopy*) se despliegan los datos de desplazamiento químico de ^1H , en los ejes vertical y horizontal, los espectros en una dimensión se muestran en ambos ejes. Por ejemplo en el espectro COSY del acetato de etilo (Fig. 4) se observa una señal en el eje horizontal ubicada en 2.08 ppm. Cuando se traza una línea perpendicular desde 2.08 ppm, se intersecta con la diagonal en el punto 3 donde aparece un pico (Fig. 3). Cuando se dibuja una línea horizontal a la

izquierda de la diagonal desde el punto 3, se encuentra con la señal en 2.08 ppm en el eje vertical. En otras palabras, el pico en el punto 3 sobre la diagonal aparece en la intersección de ambos ejes. Este tipo de pico es conocido como “pico diagonal”. Los picos 1 y 2 son picos diagonales de las señales 1.22 ppm y 4.08 ppm respectivamente. Otros dos picos p y p’ están presentes en el espectro. Estos son picos cruzados los cuales aparecen como resultado del acoplamiento spin-spin ($^3J_{H-^1H}$). Estos picos cruzados deben aparecer siempre como un par en posición emparejada (p, p’). Cuando una perpendicular al eje horizontal se dibuja desde el pico diagonal 2, cruza por el pico p. Cuando una línea horizontal es dibujada a la izquierda desde p se encuentra con la señal de 1.22 ppm. Esto indica que 1 y 2 están acoplados. Si uno está acoplado con dos, entonces dos está acoplado con uno (Nakanishi, K., 1990; Carey, F. A., *et al.*, 2011).

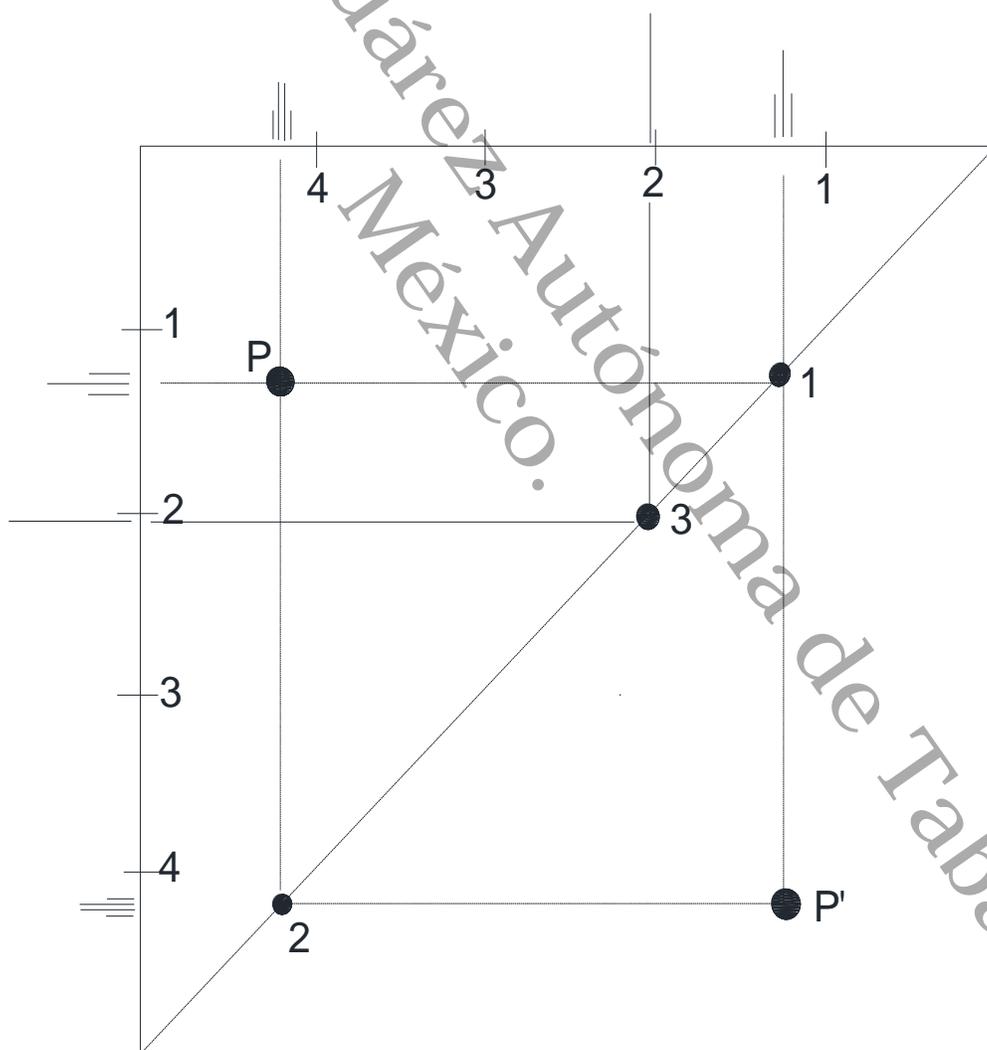


Fig. 3. Espectro H-H-COSY para el acetato de etilo.

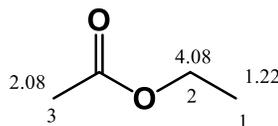


Fig. 4. Estructura molecular del acetato de etilo.

Espectro HSQC.

En el HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*, coherencia heteronuclear de cuanto único), el espectro de ^1H se grafica sobre el eje horizontal y en el eje vertical el espectro de ^{13}C . Este es un tipo de espectro COSY heteronuclear ($^1\text{J}_{\text{H}-^{13}\text{C}}$). Aparecen picos cruzados en las intersecciones de los desplazamientos químicos de ^{13}C y de ^1H , lo que indica que están directamente unidos entre sí (CH o CH_3). Para señales de ^{13}C que muestran dos picos cruzados con ^1H , sugiere que el átomo de ^{13}C está enlazado a dos átomos de ^1H no equivalentes (CH_2 , donde los ^1H , tienen un desplazamiento químico diferente)

Cuando se observan señales de ^{13}C que no forman picos cruzados con ^1H , se debe a que estos son ^{13}C cuaternarios (C), los cuales no están directamente enlazados a ^1H . Existen señales de ^1H que no forman picos cruzados con ^{13}C , lo cual se debe a que estos átomos de ^1H no están unidos a átomos de ^{13}C , y pueden ser hidrógenos de OH, NH, etc. (Nakanishi, K., 1990).

Espectro HMBC.

Debido a su notable sensibilidad, el espectro HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*, coherencia heteronuclear a múltiple enlace), es cada vez más importante y tan ampliamente utilizado como el COSY. El HMBC, muestra picos cruce debidos a acoplamiento $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ de largo alcance (correlaciones C, H a dos o tres enlaces, $^{2-3}\text{J}_{\text{H}-^{13}\text{C}}$). En el espectro no se puede determinar cuáles enlaces están a dos enlaces de distancia y cuales a 3, normalmente las correlaciones a tres enlaces de distancia son más intensas que aquellas a dos enlaces. Además no todas las correlaciones aparecen en este espectro.

En el HMBC, el espectro de ^1H se grafica sobre el eje horizontal y en el eje vertical el espectro de ^{13}C . Si se traza una línea horizontal desde una señal de carbono ubicado en el eje vertical, se intersectará

eventualmente con picos de cruce, esto indica que el carbono seleccionado tiene acoplamientos de largo alcance con los hidrógenos que corresponden a los picos de cruce (Nakanishi, K., 1990).

1.12 Comparación de varianzas.

Se pueden comparar las varianzas (o desviación estándar) de dos conjuntos de datos. Por ejemplo una prueba t normal requiere que las desviaciones estándar de los conjuntos de datos que se están comparando sean iguales. Una prueba estadística simple, llamada prueba F, se puede usar para probar esta premisa bajo la suposición de que las poblaciones siguen una distribución normal (gaussiana). La prueba F se usa también para comparar más de dos medias.

La prueba F se basa en la hipótesis nula de que las dos varianzas de la población bajo consideración son iguales $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$. El estadístico F de prueba, que se define como la relación entre las varianzas de dos muestras ($F = s_1^2/s_2^2$), se calcula y compara contra un valor crítico de F al nivel de significancia deseado. La hipótesis nula se rechaza si el estadístico de prueba difiere mucho de la unidad.

La prueba F se puede usar en el modo de una cola o en el de dos colas. Para la prueba de una cola se prueba la hipótesis alternativa de que una varianza es mayor que la otra. Por tanto, la varianza del procedimiento más preciso se coloca en el denominador y la del menos preciso en el numerador. La hipótesis alternativa es $H_a: \sigma_1^2 > \sigma_2^2$. Los valores críticos de F a un nivel de confianza se presentan en tablas. Para una prueba de dos colas, se prueba si las varianzas son diferentes, $H_a: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$. Para esta aplicación la varianza más grande siempre se coloca en el numerador. Este acomodo arbitrario de la varianza más grande en el numerador hace que el resultado de la prueba sea menos certero; por lo tanto, el nivel de incertidumbre para los valores F de la tabla se duplica de 5 a 10% (Skoog D. A., 2015).

1.12.1 Conceptos básicos de ANOVA.

En los procedimientos de ANOVA se detectan las diferencias en varias medias poblacionales mediante la comparación de varianzas. Para comparar I medias poblacionales, $\mu_1, \mu_2, \mu_3, \dots, \mu_i$, la hipótesis nula tiene la siguiente forma:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \dots = \mu_i$$

Y la hipótesis alternativa H_a es: H_a : al menos dos de las μ_i son diferentes.

En cada problema planteado, las poblaciones tienen valores distintos para una característica común conocida como factor, algunas veces, llamada tratamiento. Por ejemplo, para la determinación de calcio por un método volumétrico, el factor de interés es el analista. Los valores diferentes del factor de interés se conocen como niveles, Para el caso del calcio los niveles corresponden al número de analistas (analista 1, analista 2, etc.). Las comparaciones entre las diferentes poblaciones se efectúan cuando se mide la respuesta de la cantidad de calcio determinada por cada analista.

El factor puede considerarse como variable independiente, mientras que la respuesta es considerada como variable dependiente. En el ANOVA, los niveles de factor se denominan grupos. El principio básico es comparar la variación entre grupos con la variación intragrupal. En el ejemplo del análisis de calcio, los grupos (niveles del factor) son los analistas, y se compara la variación entre los diferentes analistas contra la variación individual de cada analista. Cuando H_0 , es verdadera, la variación entre las medias de grupos es cercana a la variación de las medias intragrupales. Cuando H_0 es falsa, la variación de las medias de los grupos es grande en comparación con la variación de las medias intragrupales. La prueba básica utilizada en el ANOVA es la prueba F, un valor grande de F en comparación con los valores críticos de las tablas puede dar una razón para rechazar H_0 a favor de la hipótesis aletrnativa. (Skoog D. A., 2015).

1.13 OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar el efecto espasmolítico y ansiolítico de los extractos y fracciones obtenidos de *Haematoxylum campechianum* (Fabaceae), así como de los compuestos aislados.

Objetivos Específicos:

- Extraer los metabolitos secundarios presentes en *Haematoxylum campechianum*, con disolventes de polaridad ascendente.
- Evaluar la actividad biológica de los extractos.
- Separar por cromatografía en columna las fracciones contenidas en los extractos de *Haematoxylum campechianum* que en la prueba biológica resultaron con mayor actividad.
- Evaluar la actividad biológica de las fracciones.
- Purificar por cromatografía en columna los compuestos químicos contenidos en las fracciones que en la prueba biológica resultaron con mayor actividad.
- Evaluar la actividad biológica de los compuestos químicos.
- Determinar las estructuras químicas de los metabolitos de interés utilizando técnicas espectroscópicas.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Obtención de los extractos orgánicos.

Se obtuvo el duramen de *Haematoxylum campechianum*, y se secó a temperatura ambiente, posteriormente se cortó en láminas delgadas y se molió con una sierra circular para carpintería. El material vegetal fue macerado iniciando con disolventes no polares hasta disolventes de polaridad alta. La maceración del material vegetal se inició con hexano ($\xi=2$), continuando con acetona ($\xi=21$), metanol ($\xi=33$) y por último con etanol-agua ($\xi=24, 78$) en una proporción 60:40 (Wade, L. G., 2013). Se agregó el primer disolvente y se dejó reposar por 24 horas, se filtró el macerado, se recuperó el disolvente y se realizó una segunda maceración, a continuación se agregó el segundo disolvente y se realizó el procedimiento anterior de manera secuencial hasta finalizar el proceso de macerado con agua-etanol. Los extractos orgánicos (ExtOrg) se filtraron y se llevaron a completa sequedad por evaporación a presión reducida con un rotaevaporador (Heidolph G3). Finalmente el material fue liofilizado en un equipo Heto Drywinner. El extracto se conservó en refrigeración (4°C) hasta su posterior uso.

2.2 Pruebas biológicas para determinar los extractos, fracciones y compuestos activos.

Los extractos, fracciones y compuestos aislados de *Haematoxylum campechianum* se analizaron en una prueba biológica *in vitro* con íleon aislado de cobayo, la cual permite determinar la capacidad que tiene un extracto, fracción o compuesto para relajar los espasmos musculares (actividad espasmolítica). Los extractos y fracciones que resultaron más potentes en la prueba de actividad espasmolítica, fueron seleccionados para realizar un fraccionamiento en columna cromatográfica abierta, para poder aislar los compuestos relacionados con dicha actividad.

Se han investigado diversas sustancias con distinta estructura química con capacidad de inhibir las contracciones del músculo liso intestinal, y se ha demostrado que existen compuestos aislados de plantas que inhiben *in vitro* la contracción del músculo liso aislado, encontrando que la capacidad de relajación depende de la concentración del compuesto, entre ellos los flavonoides: quercetina, apigenina, kaempferol y rutina (Mata, R., *et al.*, 1999; Capasso, R., *et al.*, 2000); aceites esenciales: mirreno, pineno y menleugenol (Lima, C., *et al.*, 2000).

El modelo de íleon aislado de cobayo, es una prueba farmacológica *in vitro* que fue descrita inicialmente en 1904 por Magnus (University of Edinburgh, 1970), y es utilizada para evaluar la actividad

antiespasmódica de los extractos de plantas y fármacos (Lozoya, X., *et al.*, 1990; Weimann, C.; Goransson, U., 2002; Serrano G., 2005.).

El fundamento de la prueba de íleon aislado de cobayo radica en que las porciones superior e inferior del intestino delgado son susceptibles a las acciones de las terminales nerviosas por diversas sustancias y en consecuencia, es posible valorar la actividad biológica de compuestos naturales o sintéticos (University of Edinburgh, 1970).

Se utilizaron cobayos albinos de ambos sexos con peso de 250 - 500g. Se mantuvieron en bioterio en un ambiente controlado de luz y temperatura con libre acceso al agua y alimento. Se siguieron los lineamientos éticos para el manejo y sacrificio de animales de experimentación (Gagea-Iurascu, M., *et al.* 2012). En cada sesión experimental los animales se mantuvieron en ayuno por 14 horas con acceso libre de agua. Se sacrificaron con golpe en la nuca y dislocamiento cervical. La cavidad abdominal se abrió mediante incisión longitudinal para extraer un segmento de íleon terminal de 10 cm de longitud, el cual se lavó y se mantuvo sumergido en disolución Tyrode a pH 7.0, a temperatura de 37° C y oxigenada con mezcla carbógena a burbujeo constante (Menazza, S., *et al.*, 2013). Para realizar la prueba espasmolítica, se cortó un segmento de 2 cm y se montó en un baño de órganos, en las mismas condiciones anteriormente especificadas. La disolución Tyrode se preparó un día antes de su uso y se mantuvo en refrigeración.

En un baño de órganos en solución fisiológica y condiciones adecuadas de pH, temperatura y oxigenación, al poner en contacto el tejido suspendido con los compuestos activos se produce contracción o relajación, dependiendo de la naturaleza química del compuesto. El segmento de intestino, al contraerse o relajarse modifica la tensión mecánica que ejerce, la que es convertida en señal eléctrica mediante un transductor de tensión. La señal eléctrica puede ser amplificada y registrada para cuantificar los cambios en la tensión. Para preparar la disolución Krebs-Henseleit (Tyrode), se mezclaron en gramos: NaCl (16), C₆H₁₂O₆ (4), NaHCO₃ (2), CaCl₂.2H₂O (0.4), KCl (0.4), MgCl₂. 6H₂O (0.2), y NaH₂PO₄.H₂O (0.1) y se diluyeron a un volumen de 2 L con agua destilada. La disolución se mantuvo en burbujeo de mezcla carbógena hasta ajustar el pH a 7 (Tortoriello, J., *et al.*, 1995; Thomas, A., *et al.*, 1999).

2.3 Evaluación de la actividad ansiolítica.

2.3.1 Diseño experimental para pruebas de ansiedad.

Se utilizaron ratones de la cepa ICR (machos, entre 30-45 gr) que fueron adquiridos con el distribuidor Harlan (México, D.F). Se acondicionaron por lo menos dos semanas antes de la experimentación en instalaciones con temperatura de 25 °C, con un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h, con acceso libre al agua y alimento. El manejo de los animales de experimentación se llevó a cabo de acuerdo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 que se refiere a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Durante el proceso de la experimentación, los ratones fueron trasladados a un laboratorio sonoamortiguado para contrarrestar algún sonido externo, a una temperatura de 25 °C con luz roja de 15W. Se formaron grupos de 8 ratones para cada dosis probada en los modelos de campo abierto (CA) y laberinto elevado en forma de cruz (LEC). La vía de administración fue oral (vo) e intraperitoneal (ip) según fuera el modelo a usar. Para la vía oral se utilizó una cánula metálica.

El control positivo para las pruebas de ansiedad, fue diacepam (DZP). Los tratamientos a evaluar fueron extractos orgánicos y compuestos que se disolvieron en agua (VEH), siendo el disolvente el grupo control negativo. El tratamiento que mostró el mejor efecto ansiolítico, se evaluó a diferentes dosis para la construcción de una curva dosis-respuesta.

2.3.2 Evaluación del efecto ansiolítico mediante la prueba LEC.

El laberinto elevado en forma de cruz (LEC) es reconocido como uno de los modelos experimentales de ansiedad más utilizados para bioensayo de fármacos ansiolíticos. Este modelo, basado en la libre exploración que despliegan los roedores frente a un ambiente novedoso, permite a través de su arquitectura, elegir entre dos pares de zonas distintas: un par de brazos potencialmente peligrosos (brazos abiertos) y un par de brazos seguros (brazos cerrados). En un periodo de 5 minutos se registró la actividad exploratoria y se observó si los sujetos muestran miedo incondicionado a los brazos abiertos, estas latencias para evitar los brazos abiertos son consideradas un índice de ansiedad (Gomez R., 2006).

Se evaluaron los siguientes indicadores comportamentales: porcentaje de la frecuencia y tiempo de permanencia en los brazos abiertos y cerrados del laberinto y la frecuencia de estiramientos verticales. Estos últimos indicadores de comportamiento, han sido asociados a la conducta de tipo defensivo, típico de los roedores en situaciones novedosas y potencialmente aversivas (Moreno L., et al, 2009).

2.3.3 Evaluación del efecto sedante mediante la prueba CA.

La prueba de campo abierto (CA) se realizó inmediatamente después de concluir la prueba de LEC, se colocó al ratón en el centro de una caja de acrílico para determinar su patrón conductual y actividad exploratoria durante 5 minutos. Este dispositivo cuadrado, desconocido para el roedor, previene el escape por la implementación de paredes transparentes (Polanco, L. A., 2011).

Los parámetros a evaluar fueron:

1. El número de cruces de líneas de cada cuadrante en el piso (estos se registraron solo cuando las cuatro patas de los ratones estaban completamente dentro del cuadro).
2. La frecuencia de estiramientos verticales (EV).

Los parámetros etológicos que se medirán serán:

- a) Locomoción periférica. El número de veces que se ocupó un cuadro de la periferia (P).
- b) Número de veces que el roedor atravesó el centro (C).
- c) Número de veces que el ratón se alzó en dos patas (R).

Entre cada prueba los aparatos utilizados para LEC y para CA, fueron limpiados con una disolución acuosa de etanol al 10% para eliminar rastros odoríferos dejados por los animales (Moreno L., et al, 2009).

2.4 Fraccionamiento químico de los extractos orgánicos.

El fraccionamiento cromatográfico se realizó en columnas de vidrio (tamaños de acuerdo a la cantidad de extracto obtenido, relación 1 gr de extracto por 20 gr de Sílica Gel fase normal), como soporte se utilizó sílica gel 60 de malla 70-230 y tamaño de partícula de 0.063 a 0.200 mm (Merck) de fase normal y como eluyente se usaron mezclas de disolventes que sean miscibles, a través de gradientes. Para la purificación de los compuestos de mayor polaridad se utilizó Sílica Gel con tamaño de partícula de 40 a 63 μm de fase reversa (LiChroprep RP 18, Merck). La pureza de los metabolitos y el desarrollo de la separación de las fracciones se monitoreó por cromatografía en capa fina (CCF) de fase normal (Merck F₂₅₄), y fase reversa (RP18); usando como indicadores cromogénicos al sulfato cérico amoniacal al 1% en ácido sulfúrico 2N, reactivo de flavonoides (difenilborinato de 2-aminoetilo), 4-hidroxibenzaldehído y luz ultravioleta proveniente de una lámpara portátil tipo Mineralight UV 254/336nm modelo UVSL-58. Las fracciones obtenidas se reagruparon por su semejanza observada en la cromatografía de capa

fina y se seleccionaron las fracciones que presentaron una marcada diferencia en contenido químico para su evaluación.

Los compuestos aislados se analizaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) en un cromatógrafo Waters 2996 con arreglo de fotodiodos (190-600 nm), columna de 25cm de longitud, 4.6mm de diámetro y con un tamaño de fase estacionaria de 5 μ m, fase reversa marca supelco Analytical y detector ultravioleta-visible. El proceso de elución de la muestra se realizó por gradiente de concentraciones con un flujo de 0.9 mL/min.

2.5 Equipo de Resonancia Magnética Nuclear.

La elucidación estructural se realizó por medio del análisis de los espectros de RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC y HMBC que fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker Advance III HD 600 (600 MHz para ^1H y 150 MHz para ^{13}C) con sonda de detección inversa. Las muestras fueron disueltas con cloroformo o metanol deuterado, usando como referencia interna al tetrametilsilano (TMS).

2.6 Determinación del punto de fusión.

A los compuestos aislados, se les determinó su punto de fusión en un aparato tipo Termo Scientific serie IA9000. Una pequeña cantidad de la muestra se introdujo en un tubo capilar de vidrio, el cual se colocó dentro del aparato para medir el punto de fusión. La temperatura inicial del aparato se fijó en 50 °C y se realizó el experimento aumentando la temperatura a una velocidad de un grado centígrado por minuto. La temperatura de fusión se asumió como aquella a la cual el compuesto sólido se convierte completamente en líquido.

2.7 Análisis estadístico.

Los datos de porcentajes de relajación del músculo liso (íleon de cobayo) se expresaron como la media de tres mediciones para cada punto, con un nivel de confianza del 95% ($p=0.05$). Los datos obtenidos se graficaron en curvas donde en el eje X se colocó el logaritmo de la concentración y en el eje Y la respuesta espasmolítica en porcentaje. Se utilizó el programa estadístico GraphPad prism 6 para calcular la concentración efectiva 50 (CE_{50}) y el porcentaje de relajación máxima. Las diferencias significativas respecto al estándar (papaverina) se calcularon con el programa SPSS versión 23 mediante un análisis de varianza utilizando la prueba de Dunnet (comparación de la variación del control positivo papaverina contra la variación de cada uno los tratamientos).

En las pruebas LEC y CA, las diferencias significativas respecto al control negativo (vehículo) se calcularon con el programa SPSS versión 23 mediante un análisis de varianza utilizando la prueba de Dunnet.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

CAPÍTULO III
OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS Y SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

III. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS Y SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.

3.1 Obtención del material vegetal.

Se realizó el estudio químico de *Haematoxylum campechianum* (conocido como “palo de tinto”). El material vegetal se colectó en el mes de febrero de 2016 en la ranchería Yoloxochitl Tercera Sección de Cunduacán Tabasco y un espécimen del mismo, fue depositado en el herbario de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco quedando registrada bajo el número 35455.



Fig. 5. Árbol de *Haematoxylum campechianum* (a), madera con duramen (b) y duramen molido (c).

Se taló una sección del tallo (tronco) del árbol, se secó durante 20 días a temperatura ambiente y posteriormente se separó el duramen (centro de color rojo del tallo) y se molió con una sierra circular para carpintería, el polvo obtenido pesó 19.5 Kg. (Fig. 5).

3.2 Macerado del material vegetal.

Se colocaron muestras de 5 Kg del duramen molido en un botellón de vidrio con capacidad para 19 L y se agregó el disolvente menos polar (hexano) hasta un nivel de 5 cm por encima del material vegetal, se dejó reposar el macerado durante 24 horas, a continuación se filtró el sólido y se recuperó el disolvente a presión reducida en un rotaevaporador. Al material vegetal que quedó en el recipiente de vidrio, se le realizó un segundo macerado con hexano, seguido de filtrado del macerado el cual se llevó a sequedad a presión reducida (Fig. 6). Posteriormente, se agregó el siguiente disolvente en orden creciente de polaridad (acetona), realizando el macerado dos veces, de esta forma se obtuvieron los cuatro extractos de tallo de *Haematoxylum campechianum* usando en forma secuencial los disolventes hexano, acetona, metanol y etanol-agua (60:40). Los extractos obtenidos se colocaron en una liofilizadora hasta obtener un polvo seco (Escobar-Ramos A., *et al*, 2017).

Los pesos de extracto seco obtenido fueron: 31.2 g de extracto hexánico, 183.3 g de extracto acetónico, 722.5 g de extracto metanólico y 772.6 g de extracto acuoso, mismos que se almacenaron en frascos de vidrio con tapa y se guardaron para su uso posterior.

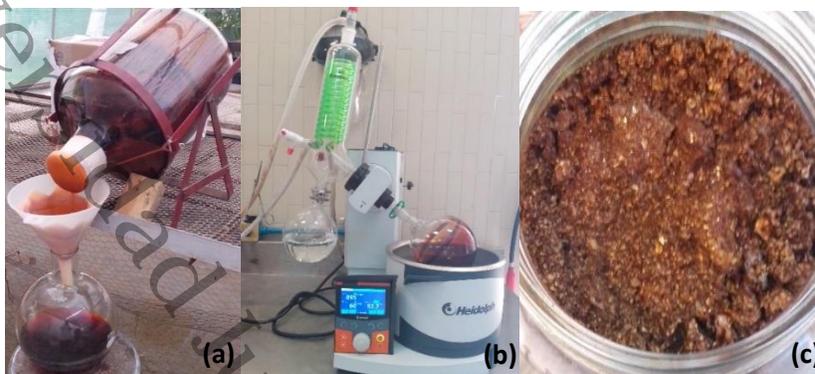


Fig. 6. Filtrado del extracto (a), recuperación del disolvente (b) y extracto seco (c).

3.3 Separación cromatográfica de los compuestos químicos contenidos en el tallo de *Haematoxylum campechianum*.

3.3.1 Obtención de las fracciones del extracto metanólico.

300 g de extracto metanólico se disolvieron con una mínima cantidad de metanol y fue absorbido con 500 g de sílica gel fase normal. Se preparó una columna cromatográfica (C5TTM) utilizando un tubo de vidrio con llave de paso y con capacidad suficiente para contener la fase estacionaria y la muestra. Se colocó un tapón de algodón en el fondo del tubo de vidrio y se agregaron 1000 g de sílica gel fase normal, la cual se activó con diclorometano, finalmente se depositó el extracto adsorbido en sílica gel y se colocó un tapón de algodón sobre el extracto para evitar la difusión de los compuestos hacia arriba de la columna. La separación cromatográfica se realizó utilizando un sistema de gradiente de elución con diclorometano-metanol, comenzando con 100% de diclorometano, y aumentando la polaridad de la fase móvil con 10% de metanol hasta obtener 9 fracciones.

El análisis de las fracciones obtenidas por cromatografía en capa fina (CCF) nos permitió concluir que las fracciones 1 a 4 no contienen los metabolitos de interés para nuestro estudio que está enfocado a compuestos con actividad ansiolítica y que la revisión bibliográfica establece como compuestos de tipo flavonoides (Estrada-Reyes, R., 2012).

En las fracciones 5 a 9 se observa un contenido químico que incluye a flavonoides, puesto que contienen compuestos que son similares a la señal observada para el flavonoide quercetina (Q), que se utilizó como

estándar (Fig. 7). Dichas fracciones se sometieron a una prueba biológica *in vitro*, en íleon aislado de cobayo, lo que permitió determinar que las fracciones 6 a 8 fueron las más eficaces para relajar la contracción muscular; a una concentración de 400 µg/ml los porcentajes de inhibición fueron de 61.02±4.55; 56.29±1.20 y 64.48±4.84% respectivamente (Tabla 3).

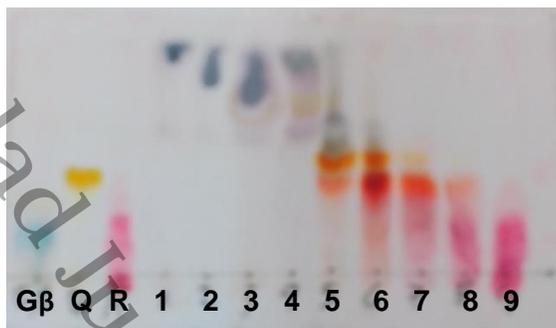


Fig. 7. Placa CCF (diclorometano-metanol 9:1), columna C5TTM. Revelador: 4-hidroxibenzaldehído. Estándar: Glucósido de β -sitosterol (G β) y Quercetina (Q). Referencia (R).

3.3.2 Compuestos aislados del extracto metanólico.

La fracción 6 (11.59 g) se adsorbió en 12 g de sílica gel fase normal y se separó en columna cromatográfica (C5TTMF6), utilizando 175 g de sílica gel fase normal, con un sistema de elución de diclorometano-metanol, la separación comenzó utilizando 100% de diclorometano y la polaridad del sistema se incrementó agregando 5% de metanol hasta obtener 15 fracciones. La fracción 7 (2.44 g) se obtuvo en un sistema de elución diclorometano-metanol 85:15, se adsorbió en 2 g de sílica gel fase normal y se purificó en una columna cromatográfica (C5TTMF6F7), utilizando 25 g de sílica gel fase normal y como fase móvil un sistema gradiente con diclorometano-metanol, la separación comenzó utilizando 100% de diclorometano y la polaridad del sistema se incrementó agregando 5% de metanol hasta obtener 8 fracciones. Las fracciones 6 (C5TTMF6F7F6, 1.14 g) y 7 (C5TTMF6F7F7, 162.6 mg), se purificaron en columna sílica gel fase reversa.

La fracción 6 se adsorbió en una mezcla de 0.5g de sílica gel fase normal y 0.5g de sílica gel fase reversa y se separó en una columna cromatográfica (C5TTMF6F7F6) utilizando 10 g de sílica gel fase reversa y un sistema de elución de agua-acetonitrilo, la separación comenzó utilizando 100% de agua y la polaridad del sistema se disminuyó agregando 5% de acetonitrilo hasta obtener 17 fracciones. La fracción 12 fue obtenida en un sistema de agua-acetonitrilo 7:3, identificada como la 3-desoxisappanchalcona (compuesto 2, 48.3 mg). El mismo procedimiento se utilizó para separar

C5TTMF6F7F7, 162.6 mg, obteniendo 12 fracciones. La fracción 8 fue identificada como sappanchalcona (compuesto **1**, 50.6 mg), la cual se obtuvo en agua-acetonitrilo 8:2.

La fracción 8 (14.0 g) se adsorbió en 12 g de sílica gel fase normal y se separó en columna cromatográfica abierta (C5TTMF8), utilizando 170 g de sílica gel fase normal, y un sistema gradiente de elución con diclorometano-metanol, la separación comenzó utilizando 100% de diclorometano y la polaridad del sistema se incrementó agregando 5% de metanol hasta obtener 17 fracciones. La fracción 5 (2.2 g) fue recuperada en un sistema de elución diclorometano-metanol 85:15, la cual se adsorbió en una mezcla de 1 g de sílica gel fase normal y 1 g de sílica gel fase reversa y se purificó en columna (C5TTMF8F5) con 18 g de sílica gel fase reversa, para obtener las fracciones 4 (C5TTMF8F5F4, 251.3 mg) en agua-acetonitrilo 94:6 y la 6 (C5TTMF8F5F6, 683 mg) en agua-acetonitrilo 88:12. La F4 se sometió a una reacción de acetilación para disminuir la polaridad de los compuestos y lograr su separación, a continuación se repurificó en columna cromatográfica abierta (C5TTMF8F5F4), utilizando 10 g de sílica gel fase normal, y un sistema de elución con diclorometano-acetona, la separación comenzó utilizando 100% de diclorometano y la polaridad del sistema se incrementó agregando 2% de acetona hasta obtener 10 fracciones. La fracción 1, fue identificada como hematoxilol A (compuesto **3a**, 134 mg), recuperado en diclorometano-acetona 98:2. Por otra parte, la C5TTMF8F5F6 se purificó en columna cromatográfica con 10g de sílica gel fase reversa, para obtener 11 fracciones. La fracción F5 (50.4 mg) se recuperó en agua-acetonitrilo 88:12, misma que fue acetilada, y se purificó en columna cromatográfica (C5TTMF8F5F6F5), utilizando 10 g de sílica gel fase normal, y un sistema gradiente de elución de diclorometano-acetona la separación comenzó utilizando 100% de diclorometano y la polaridad del sistema se incrementó agregando 2% de acetona hasta obtener 13 fracciones. La fracción 4, fue identificada como el 4-*O*-metihematoxilol (compuesto **4a**, 13 mg), recuperada en diclorometano-acetona 96:4, y la fracción 8, fue identificada como hematoxina (compuesto **5a**, 9 mg), recuperada en diclorometano-acetona 92:8.

Los compuestos aislados del extracto metanólico, fueron analizados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), el cromatograma (Fig. 8) muestra las señales de los compuestos que fueron separados. Las muestras fueron disueltas en metanol grado HPLC para obtener una concentración del analito de 3 mg/L, un mililitro de esta disolución se inyectó a la columna fase reversa, el proceso de separación se llevó a cabo por el método de gradiente de concentración de la fase móvil y los picos de los compuestos fueron graficados usando un detector ultravioleta-visible (Escobar-Ramos A., *et al*,

2017). Los resultados indican que el compuesto más polar es el 4-*O*-hidroxihematoxilol **6** con una señal que se observa a los 8.797 minutos y el menos polar es la 3-desoxisappanchalcona **2** que eluyó a los 18.289 minutos. El carácter polar de los compuestos se debe principalmente al número de grupos hidroxilos que posee la molécula.

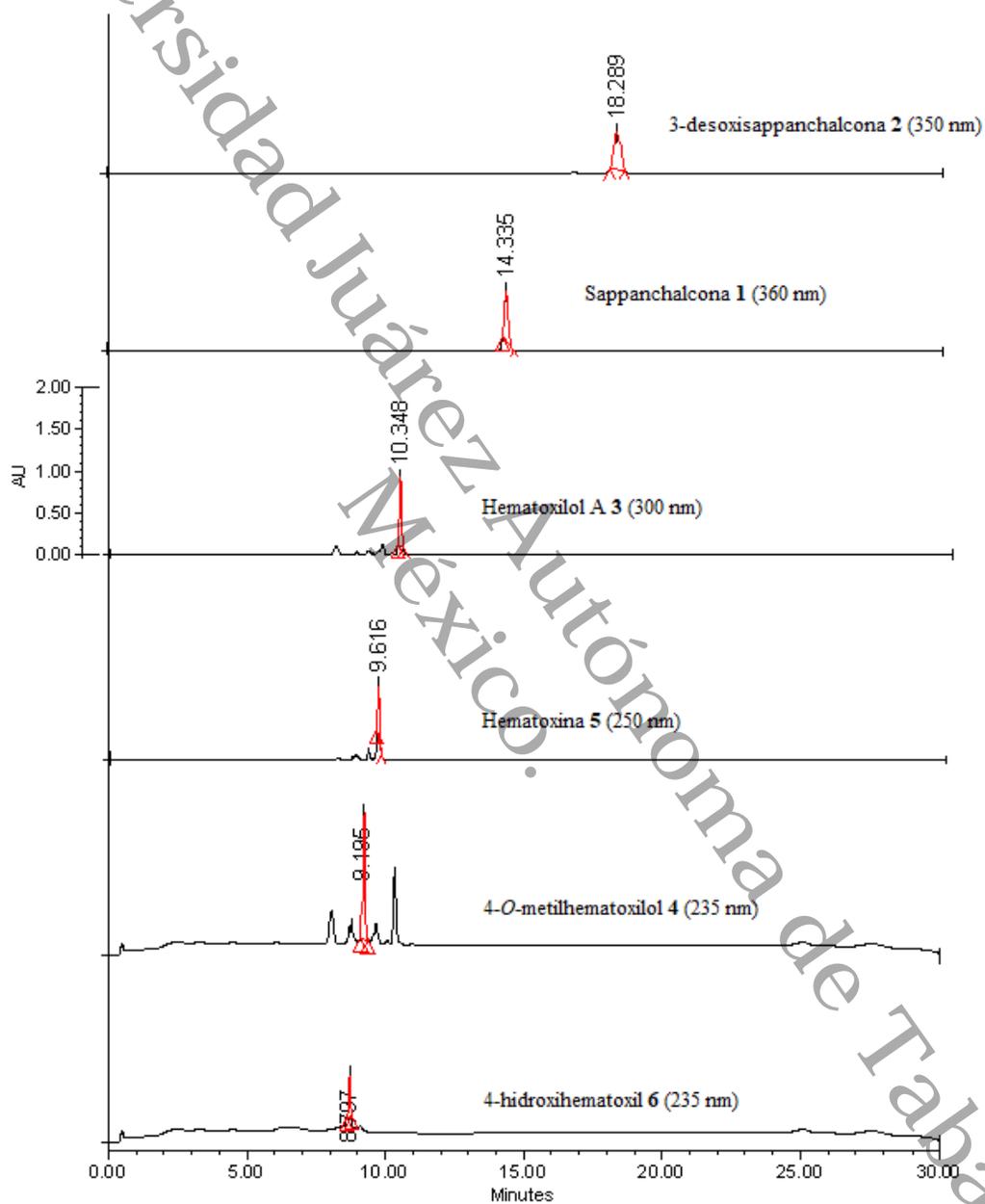


Fig. 8. Resultados del análisis CLAR de los 6 compuestos aislados de *Haematoxylum campechianum*.

3.3.3 Obtención de las fracciones del extracto acuoso.

Los 400 g de extracto acuoso (etanol-agua 60:40) se disolvieron con una mínima cantidad de metanol y se mezclaron poco a poco con 260 g de sílica gel fase normal hasta obtener un polvo fino y seco. Se preparó una columna cromatográfica (C6TTA) utilizando un tubo de vidrio con llave de paso y con capacidad suficiente para contener la fase estacionaria y la muestra. Se colocó un tapón de algodón en el fondo del tubo de vidrio y se agregaron 600 g de sílica gel fase normal, la cual se activó con diclorometano, finalmente se depositó el extracto adsorbido en sílica gel y se colocó un tapón de algodón sobre el extracto para evitar la difusión de los compuestos hacia arriba de la columna. La separación cromatográfica se realizó utilizando un sistema de gradiente de elución con diclorometano-metanol, comenzando con 100% de diclorometano, y aumentando la polaridad de la fase móvil con 10% de metanol hasta obtener 10 fracciones.

El análisis de las fracciones obtenidas por cromatografía en capa fina (CCF) nos permitió concluir que las fracciones 1 a 3 no contienen los metabolitos de interés para nuestro estudio que está enfocado a compuestos con actividad ansiolítica y que la revisión bibliográfica establece como compuestos de tipo flavonoides (Estrada-Reyes, R., 2012). En una placa de CCF los flavonoides se observan como manchas de color amarillo o naranja (Fig. 9).

En las fracciones 4 a 10 se observa un contenido químico característico de flavonoides, por lo que estas fracciones se sometieron a una prueba biológica *in vitro*, en íleon aislado de cobayo. Los resultados de la prueba *in vitro*, mostraron que todas las fracciones del extracto acuoso fueron activas para relajar la contracción muscular. A una concentración de 400 µg/ml el porcentaje de inhibición fue mayor a 75% (Tabla 4).

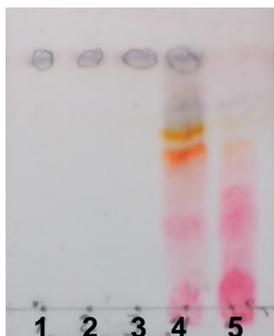


Fig. 9. Placa CCF (diclorometano-metanol 9:1), columna C6TTM. Revelador: Flavonoides.

3.3.4. Compuestos aislados del extracto acuoso.

La fracción 5 (32.6 g) se adsorbió en 25 g de sílica gel fase normal y se separó en columna cromatográfica (C6TTAF5), utilizando 250 g de sílica gel fase normal, con un sistema de elución de diclorometano-metanol, la separación comenzó utilizando 100% de diclorometano y la polaridad del sistema se incrementó agregando 5% de metanol hasta obtener 7 fracciones. La fracción 4 (2.0 g) se obtuvo en un sistema de elución diclorometano-metanol 75:25, se adsorbió en una mezcla de 1 g de sílica gel fase normal y 1 g de sílica gel fase reversa; a continuación se purificó en una columna cromatográfica (C6TTAF5F4), utilizando 10 g de sílica gel fase reversa y como fase móvil un sistema gradiente con agua-acetonitrilo, la separación comenzó utilizando 100% de agua y la polaridad del sistema se disminuyó agregando 2% de acetonitrilo hasta obtener 11 fracciones. El análisis de CCF (Fig. 10) permitió determinar que la fracción 6 corresponde a sappanchalcona (compuesto **1**) y la fracción 8 es 3-desoxisappanchalcona (Compuesto **2**), que también fueron identificadas en el extracto metanólico. La fracción 3 (C6TTAF5F4F3, 370 mg) se adsorbió en una mezcla de 0.5 g de sílica gel fase normal y 0.5 g de sílica gel fase reversa y se purificó en columna (C6TTAF5F4F3) con 10 g de sílica gel fase reversa, para obtener la fracción 3 (C6TTAF5F4F3F3, 36.9 mg) en agua-acetonitrilo 96:4 y que fue identificada como hematoxina (compuesto **5**) y la fracción 6 (C6TTAF5F4F3F6, 8.1 mg) en agua-acetonitrilo 90:10, que corresponde a hematoxilol A (compuesto **3**).

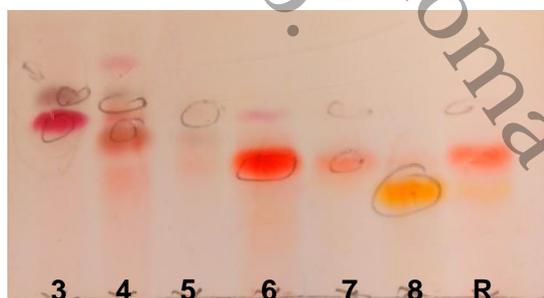


Fig. 10. Placa CCF (Agua-Acetonitrilo 6:4), columna C6TTAF5F4. Revelador: 4-hidroxibenzaldehído.

La fracción 4 (C6TTAF5F4F4, 531 mg) se adsorbió en una mezcla de 0.5 g de sílica gel fase normal y 0.5 g de sílica gel fase reversa y se purificó en columna (C6TTAF5F4F4) con 10 g de sílica gel fase reversa, para obtener la fracción 6 (C6TTAF5F4F4F6, 5 mg) en agua-acetonitrilo 88:12 (Fig. 11), el

cual es un compuesto nuevo del que no existen reportes en la literatura, y de acuerdo con su estructura molecular se le asignó el nombre de 4-hidroxihematoxil (compuesto **6**).

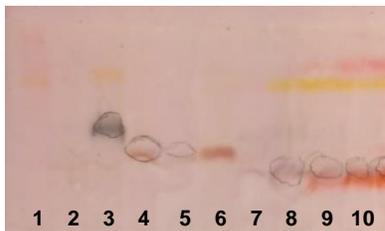


Fig. 11. Placa CCF (Agua-Acetonitrilo 7:3), columna C6TTAF5F4F4. Revelador: 4-hidroxibenzaldehído.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

CAPÍTULO IV
EVALUACIÓN BIOLÓGICA *in vitro*.

IV. EVALUACION BIOLÓGICA *in vitro*.

4.1 EVALUACIÓN ESPASMOLÍTICA.

Se realizó la evaluación espasmolítica de los extractos hexánico, acetónico, metanólico e hidroalcohólico (40:60) del tallo de *Haematoxylum campechianum*, en íleon aislado de Cobayo. Los extractos se disolvieron en disolución Krebs-Henseleit (disolución de Tyrode).

El íleon de cobayo recién extraído se lavó por dentro con la disolución Tyrode, para eliminar residuos de alimento, se depositó en un vaso de precipitados que contenía dicha disolución a 37 °C y se mantuvo con burbujeo de oxígeno durante el tiempo que duró la prueba.

Se seccionó un segmento de íleon de 2 cm de longitud para cada prueba. El tramo seccionado se sujetó con un hilo quirúrgico por un extremo y por el otro se fijó al sensor de corriente, se colocó en la cámara de vidrio del equipo fijando un extremo del hilo a un sensor de tensión mecánica del equipo de medición espasmolítica. La cámara contiene 20 mL de la disolución tyrode con burbujeo de oxígeno para mantener en condiciones viables al tejido.



Fig. 12. Equipo para pruebas espasmolíticas: Íleon de cobayo en el portamuestra (a), portamuestra del equipo (b) y aparato que controla los pulsos eléctricos aplicados (c).

4.1.1 Evaluación espasmolítica de los extractos obtenidos del tallo de *Haematoxylum campechianum*.

Una vez que se colocó el segmento de íleon en el baño de órganos y se estabilizó el sistema, se indujo la contracción muscular por estimulación eléctrica, aplicando una tensión de 5 voltios, por medio de electrodos conectados directamente al tejido, utilizando un estimulador Grass S88 equipado con polígrafo Grass 7D (Fig. 12), hasta conseguir un mínimo de tres respuestas uniformes con altura máxima, la cual se registró como señal de referencia. Después que la contracción fue estable, el tejido se expuso a diferentes concentraciones de los extractos obtenidos de *Haematoxylum campechianum*,

para generar las respuestas de relajación del tejido en presencia del extracto mediante tensión eléctrica. Para cada concentración probada los pulsos de corriente se mantienen hasta alcanzar una altura mínima constante en la señal de respuesta del tejido, los datos obtenidos son almacenados en una computadora. Posteriormente se efectúan tres lavados al tejido con disolución Tyrode, se afora la cámara a 20 ml y se permite que el tejido recupere su estado de contracción inicial, a continuación se registran los datos de altura de señal base aplicando voltaje al tejido, mientras este se encuentra en la disolución Tyrode y entonces se agrega el extracto a la siguiente concentración a probar, finalmente se registran las respuestas de relajación del tejido cuando las señales alcanzan una altura mínima constante. El proceso de obtención de datos se repite hasta realizar todas las pruebas programadas. Cuando el tejido no recupera su estado de contracción inicial, se procede a cambiarlo por uno nuevo.

Aunque la unión de un fármaco a un receptor puede medirse directamente, lo que suele interesar es una respuesta biológica, como un aumento de la presión arterial, la contracción o relajación de una tira de músculo liso en un baño para órganos, la activación de una enzima o una respuesta conductual; esto suele representarse gráficamente en forma de una curva de concentración-efecto (in vitro) o de curva de dosis-respuesta (in vivo). Estas curvas nos permiten calcular la respuesta máxima que puede producir el fármaco ($E_{máx}$) y la concentración o dosis necesaria para originar la mitad de la respuesta máxima (CE_{50} o DE_{50}), unos parámetros muy útiles para comparar la potencia de diferentes fármacos con efectos cualitativos similares (Rang, H. P., 2012).

Los datos de porcentajes de inhibición de la contracción (relajación) se expresaron como la media de tres mediciones para cada punto, con un nivel de confianza del 95% ($p=0.05$), y se graficaron en curvas de logaritmo de la concentración contra respuesta de relajación en porcentaje (Fig. 13). Se utilizó el programa estadístico GraphPad prism 6 para calcular la concentración efectiva 50 (CE_{50}) y el porcentaje de relajación máxima. Las diferencias significativas respecto al estándar (papaverina) se calcularon con el programa SPSS versión 23 mediante un análisis de varianza utilizando la prueba de Dunnet.

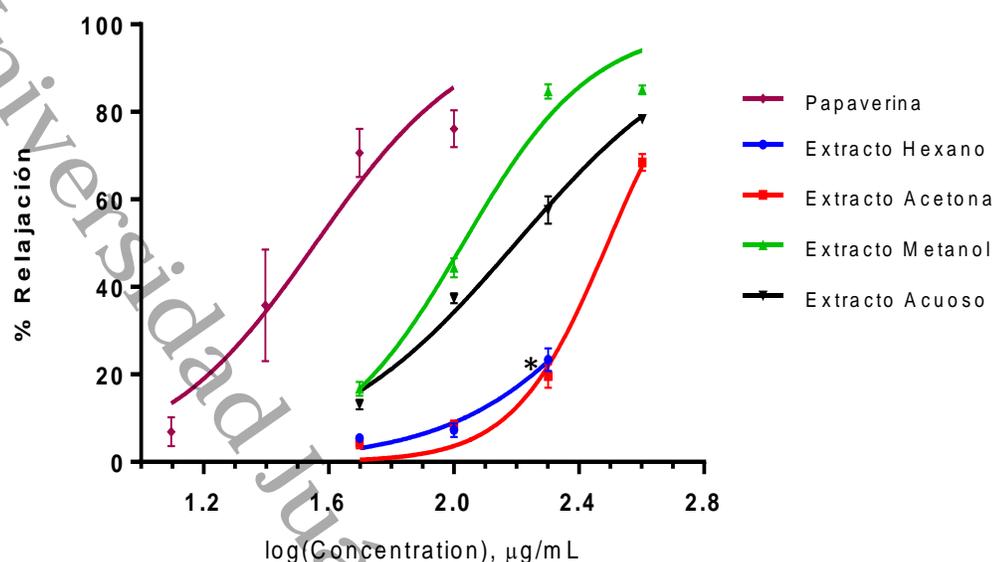


Fig. 13. Relación concentración-respuesta de los extractos del tallo de *Haematoxylum campechianum* para concentraciones de 50 a 400 µg/ml, comparados con papaverina (+). * Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto a papaverina (SPSS 23).

Tabla 2. Concentración efectiva 50 y porcentaje de relajación máxima para los extractos del tallo de *Haematoxylum campechianum* comparados con papaverina (+).

Extracto	Concentración Efectiva 50 (CE ₅₀ =µg/mL)	% Relajación (E _{max})
Hexánico	426.20±118.51	ND
Acetónico	310.60±19.01	68.40±4.78
Metanólico	107.20±11.48	85.04±2.43
Acuoso	157.90±10.20	78.34±0.53
Control (+) Papaverina	36.21±6.55	76.63±5.14

Los resultados muestran que los extractos más activos para inhibir las contracciones musculares son: el metanólico y el acuoso con porcentajes de relajación máxima de 85.04 ± 2.43 y 78.34 ± 0.53 , respectivamente (Tabla 2); resultados que superan al porcentaje de relajación máxima de la referencia papaverina (76.63 ± 5.14). El análisis de varianza demostró que los datos obtenidos para el extracto hexánico tienen diferencia significativa ($p=0.05$) respecto a la referencia papaverina, por lo que no tiene efecto significativo en la relajación muscular.

Los fármacos que actúan como agonistas de algún modo activan el receptor al ocuparlo, o antagonistas, aquellos que no producen activación. Sin embargo, la capacidad de una molécula del fármaco para activar el receptor es en realidad una propiedad graduada y no un fenómeno de «todo o nada». Si se analiza en un sistema biológico determinado una serie de agonistas químicamente parecidos que actúan sobre los mismos receptores, se observa a menudo que la respuesta máxima (la respuesta más intensa que puede provocar ese fármaco a una concentración elevada) varía de unos fármacos a otros. Algunos compuestos (conocidos como agonistas puros) producen una respuesta máxima (la mayor respuesta que puede dar el tejido), mientras que otros (agonistas parciales) solo desencadenan una respuesta inferior al máximo. Estas diferencias se expresan cuantitativamente como eficacia (e), un parámetro definido originalmente por Stephenson (1956) que indica la «capacidad» de un único complejo agonista-receptor para desencadenar una respuesta tisular (Rang, H. P., 2012).

La capacidad de un fármaco para activar un receptor y generar una respuesta celular es un reflejo de su eficacia. Un fármaco con alta eficacia es un agonista puro, que a una concentración dada alcanzará una respuesta máxima (100%). Un fármaco con una menor eficacia sobre el mismo receptor, no alcanzará la respuesta máxima a ninguna dosis. La capacidad de un fármaco de producir un efecto está relacionada con su afinidad por el receptor, y por la activación para producir una respuesta biológica. El grado (proporción del máximo) en el cual un fármaco activa a un sistema biológico se conoce con el nombre de actividad intrínseca o eficacia. La eficacia de un fármaco es el máximo efecto farmacológico que se puede obtener, por encima del cual a pesar de que se incrementen las dosis no se obtiene un efecto mayor. La eficacia no está relacionada con la potencia y por lo tanto tampoco con la dosis o la concentración. La medida de la eficacia es la E_{max} , cuanto menor sea ésta menos efectivo es el fármaco en producir un efecto, en este sentido la dosis no influye en la eficacia. Un fármaco que se une a un receptor y exhibe cero eficacia es un antagonista. (Goodman, L. S., Gilman, A., 2011.).

En las pruebas espasmolíticas, el porcentaje de relajación máxima del íleon establece la eficacia del fármaco probado, entre más cercano a 100% se encuentre este valor el fármaco tendrá mayor eficacia para relajar el músculo liso.

Los extractos metanólico y acuoso muestran los valores más bajos de concentración efectiva $50, 107.2 \pm 11.48$ y 157.9 ± 10.20 respectivamente, resultados que muestran la baja potencia de estos extractos respecto a la referencia papaverina (36.21 ± 6.55). La CE_{50} determina la potencia del fármaco probado, entre más bajo sea este valor mayor potencia tiene el fármaco y por tanto se requiere menor dosis. Potencia se refiere a la “concentración” de fármaco para obtener un efecto determinado; la potencia de

un fármaco no es sinónimo de la magnitud del efecto, por lo tanto baja potencia indica que se necesita una dosis más elevada que otro fármaco para obtener el mismo efecto (Goodman, L. S., Gilman, A., 2011.).

Los mejores resultados de potencia y eficacia de los extractos nos permitió seleccionar al metanólico y acuoso para continuar con el estudio de los compuestos contenidos en los mismos mediante fraccionamiento de dichos extractos en columnas cromatográficas, utilizando como fase estacionaria sílica gel fase normal y reversa con sistemas de elución que permitan la separación de los compuestos.

4.1.2 Evaluación espasmolítica de las fracciones F5 a F9 obtenidas del extracto metanólico.

La separación cromatográfica del extracto metanólico generó nueve fracciones, de la cuales se evaluaron las fracciones F5 a F9 en el modelo biológico *in vitro* (Fig. 14). El comportamiento de los porcentajes de relajación muscular indican que existe un efecto de dependencia de la concentración para las fracciones F5, F6, F7 y F8 a 400 $\mu\text{g/ml}$ con una inhibición de 48.68 ± 6.17 ; 61.02 ± 4.55 ; 56.29 ± 1.20 y 64.48 ± 4.84 % respectivamente (Tabla 3); F9 mostró un efecto menor (24.38 ± 3.43 %), con diferencia significativa respecto al estándar papaverina que tiene un porcentaje de relajación máximo de 76.63 ± 5.14 . El análisis de varianza ($p=0.05$) indica que los datos obtenidos para las fracciones F5 y F9, tienen diferencia significativa respecto a la referencia papaverina, por lo que el efecto que producen para la relajación del músculo liso es muy bajo, siendo los mejores resultados de relajación para las fracciones F6 a F8, con eficacia similar al estándar papaverina.

Es importante notar que el extracto metanólico tiene mayor porcentaje de inhibición que sus fracciones, efecto que puede atribuirse a la separación de compuestos activos que al encontrarse aislados muestran una disminución del porcentaje de inhibición. Lo que indica un efecto sinérgico entre los compuestos que constituyen el extracto metanólico.

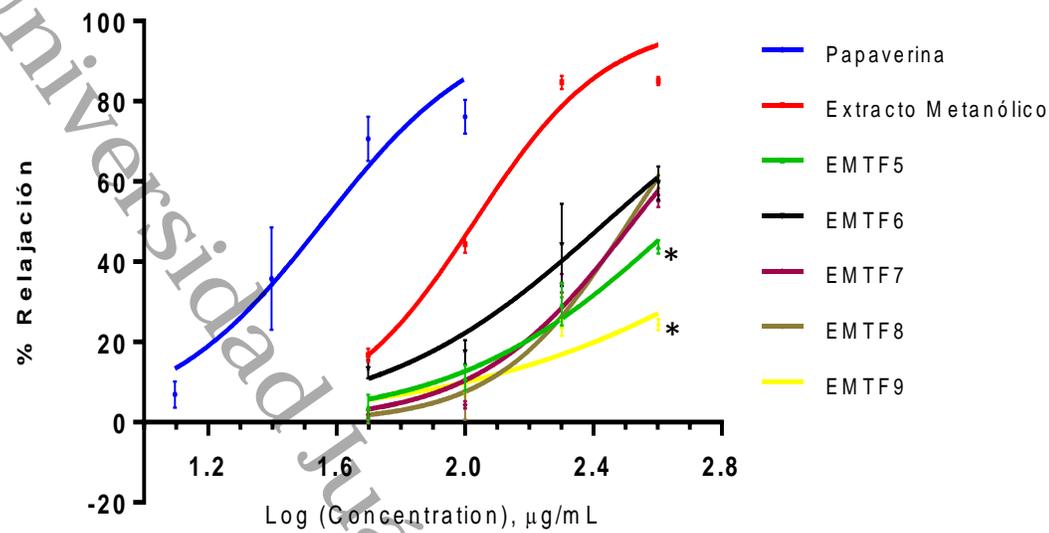


Fig. 14. Relación concentración-respuesta del extracto metanólico y fracciones del tallo de *Haematoxylum campechianum* para concentraciones de 50 a 400 µg/mL comparados con papaverina (+). * Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto a papaverina (SPSS 23).

Los resultados más bajos de porcentaje de concentración efectiva 50, se obtuvieron para las fracciones F6 a F8, 276.4 ± 47.8 , 335.2 ± 38.8 y 324.3 ± 20.3 respectivamente, siendo menos potentes que papaverina (36.21 ± 6.55).

El análisis de resultados de la prueba espasmolítica nos permitió seleccionar las fracciones F6 a F8 del extracto metanólico de *Haematoxylum campechianum* para continuar con el fraccionamiento cromatográfico para aislar los compuestos de interés.

Tabla 3. Concentración efectiva 50 y porcentaje de relajación máxima para el extracto y fracciones metanólicas del tallo de *Haematoxylum campechianum* comparados con papaverina (+).

Extracto, Fracción y Compuesto	Concentración Efectiva 50 (CE ₅₀ =μg/mL)	% Relajación (E _{max})
Extracto Metanólico	107.20±11.48	85.04±2.43
Fracciones		
EMTF5	464.01±78.20	48.68±6.17
EMTF6	276.40±47.80	61.02±4.55
EMTF7	335.20±38.80	56.29±1.20
EMTF8	324.30±20.30	64.48±4.84
EMTF9	ND	24.38±3.43
Control (+) Papaverina	36.21±6.55	76.63±5.14

4.1.3 Evaluación espasmolítica de las fracciones F4 a F10 obtenidas del extracto acuoso.

La separación cromatográfica del extracto acuoso permitió obtener 10 fracciones, la evaluación en el modelo biológico se realizó para las fracciones F4 a F10 (Fig. 15). El comportamiento de los porcentajes de inhibición indica que existe un efecto de dependencia de la concentración. Todas las fracciones mostraron un porcentaje de relajación máxima mayor a 75%, similar al de papaverina (76.63±5.14%), lo que indica buena eficacia para las fracciones probadas.

Los resultados más bajos de porcentaje de concentración efectiva 50, se obtuvieron para las fracciones F5 a F8, 73.71 ± 9.11, 78.79 ± 12.8, 72.84 ± 43.31 y 49.96 ± 11.4 respectivamente (Tabla 4), resultados comparables con la referencia papaverina (36.21 ± 6.55), lo que sugiere buena potencia para estas fracciones.

Todas las fracciones probadas del extracto acuoso muestran mayor porcentaje de relajación muscular, lo que sugiere su eficacia contra la diarrea, para lo cual se utiliza de manera tradicional el tallo de este árbol.

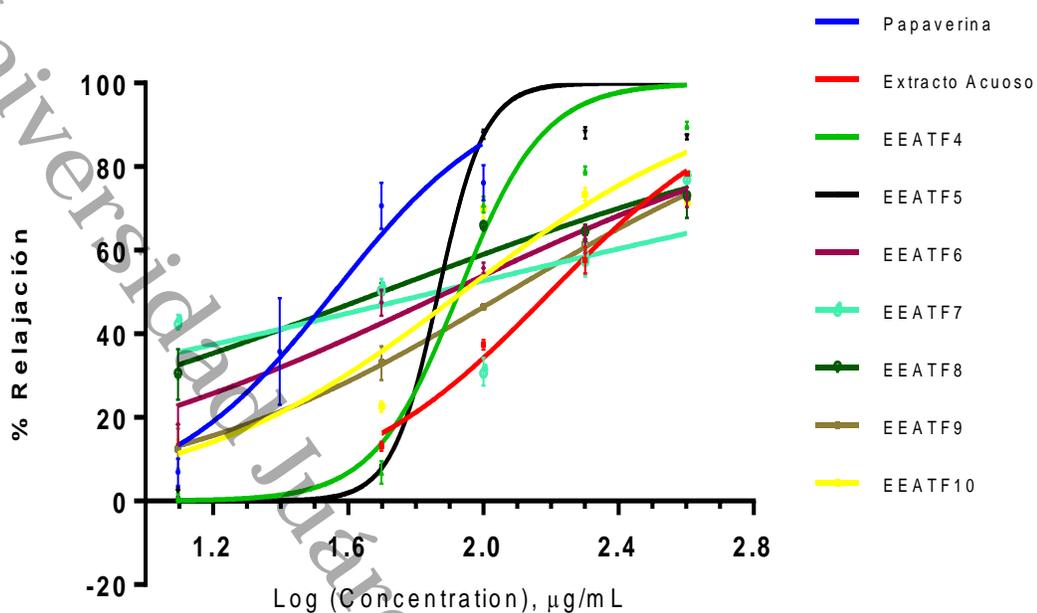


Fig. 15. Relación concentración-respuesta del extracto acuoso y fracciones del tallo de *Haematoxylum campechianum* para dosis de 12.5 a 400 $\mu\text{g/mL}$ comparados con papaverina (+).

Tabla 4. Concentración efectiva 50 y porcentaje de relajación máxima para el extracto acuoso y fracciones del tallo de *Haematoxylum campechianum* comparados con papaverina (+).

Extracto, Fracción y Compuesto	Concentración Efectiva 50 (CE ₅₀ = $\mu\text{g/mL}$)	% Relajación (E _{max})
Extracto Acuoso	157.90 \pm 10.20	78.34 \pm 0.53
Fracciones		
EEATF4	84.77 \pm 11.18	89.91 \pm 2.08
EEATF5	73.71 \pm 9.11	87.15 \pm 1.49
EEATF6	78.79 \pm 12.80	75.94 \pm 2.72
EEATF7	72.84 \pm 43.31	77.30 \pm 2.38
EEATF8	49.96 \pm 11.40	76.14 \pm 3.41
EEATF9	118.80 \pm 9.50	89.17 \pm 3.51
EEATF10	86.77 \pm 24.05	90.52 \pm 11.12
Control (+)		
Papaverina	36.21 \pm 6.55	76.63 \pm 5.14

El análisis de resultados de la prueba espasmolítica nos permitió seleccionar las fracciones F5 a F8 del extracto acuoso de *Haematoxylum campechianum* para continuar con el fraccionamiento cromatográfico para aislar los compuestos de interés.

4.1.4 Evaluación espasmolítica de los compuestos **1-2** y **3a-5a**.

La separación cromatográfica de las fracciones activas para relajación muscular (EMTF6 a EMTF8) permitió aislar cinco compuestos que al ser probados en el modelo de íleon aislado de cobayo (Fig. 16), se determinó que los compuestos **1** y **2** mostraron un efecto de inhibición máxima de 50.94 ± 9.58 y 51.25 ± 1.60 % respectivamente (Tabla 5), similar al de papaverina 76.63 ± 5.14 % que se empleó como compuesto de referencia (Tabla 4). Estos resultados indican que la sappanchalcona (compuesto **1**) y la 3-desoxisappanchalcona (compuesto **2**), tienen una eficacia media para relajar el musculo liso. Los compuestos **3a-5a** (acetilados) no mostraron actividad espasmolítica, lo que se confirma con los resultados del análisis de varianza que muestran diferencia significativa ($p=0.05$) para los datos de los compuestos **3a-5a** respecto a la referencia papaverina.

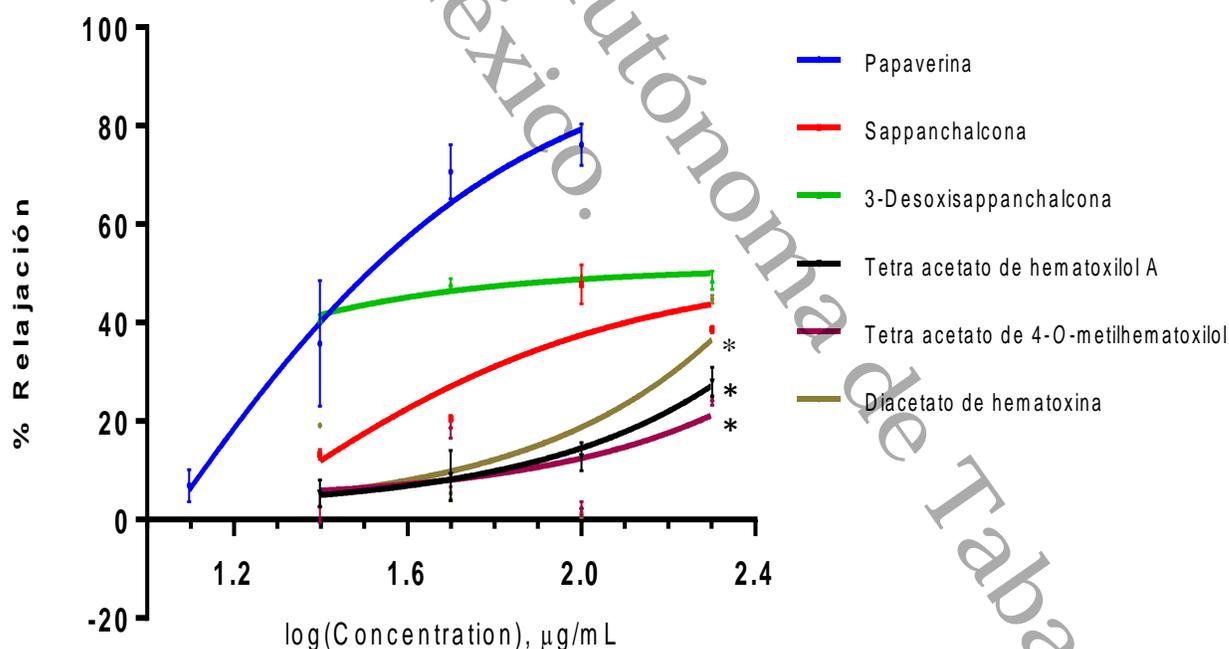


Fig. 16. Relación concentración-respuesta del efecto de relajación de los compuestos aislados del extracto metanólico para dosis de 25 a 200 µg/ml, comparados con papaverina. * Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto a papaverina (+) (SPSS 23).

Los resultados para la concentración efectiva 50, indican que los compuestos aislados tienen baja potencia para actuar como relajante muscular con valores por arriba de 200µg/mL, que no son comparables con la referencia papaverina (36.21 ± 6.55).

Tabla 5. Concentración efectiva 50 y porcentaje de relajación máxima para los compuestos aislados del tallo de *Haematoxylum campechianum* comparados con papaverina (+).

Compuesto	Concentración Efectiva 50 (CE ₅₀ =µg/mL)	% Relajación (E _{max})
Sappanchalcona 1	257.10±131.40	50.94±9.58
3-Desoxisappanchalcona 2	ND	51.25±1.60
Tetra acetato de hematoxilol A 3a	513.60±193.40	ND
Tetra acetato de 4- <i>O</i> -metilhematoxilol 4a	ND	ND
Diacetato de hematoxina 5a	207.60±26.40	ND
Control (+)		
Papaverina	36.21±6.55	76.63±5.14

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

CAPÍTULO V
PRUEBA DE ANSIEDAD EN LEC Y CA.

V. PRUEBA DE ANSIEDAD EN LEC Y CA.

5.1 Prueba de laberinto Elevado en forma de Cruz (LEC).

5.1.1 Resultados de las pruebas LEC para el extracto metanólico.

En la prueba LEC, se observó que para todos los tratamientos evaluados del extracto metanólico de *Haematoxylum campechianum* (EMT) se incrementan los parámetros de tiempo que el ratón permanece en los brazos abiertos (TBA) y el número de entradas a los brazos abiertos (EBA). La dosis de 200 mg/Kg del extracto metanólico y acuoso de la planta (Fig. 17 y 19), así como la dosis de 10 mg/Kg del compuesto sappanchalcona (Fig. 21), incrementaron el parámetro TBA en segundos, con 76.32 ± 6.35 , 66.68 ± 20.64 y 60.07 ± 14.28 , respectivamente (Tablas 6, 7 y 8). Estos datos indican que la planta tiene una composición química con efecto ansiolítico y que la chalcona aislada posee dicha actividad.

Tabla 6. Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (TBA), porcentaje de entradas a los brazos abiertos (EBA) y número de veces que el ratón se asoma y alza en dos patas en LEC. Prueba realizada administrando vía oral el extracto metanólico del tallo (EMT) de *Haematoxylum campechianum* para dosis de 25 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.

Tratamiento	%TBA	%EBA	Asomadas	Alzadas
Control (-)	22.04±13.13	28.56±10.41	24.60±13.17	28.80±12.38
Diazepam 1	74.06±23.42	70.13±26.41	21.40±6.73	9.20±7.37
EMT 25	67.59±13.10	60.24±17.04	8.20±8.49	15.60±9.37
EMT 50	61.54±7.25	56.53±8.71	19.40±18.99	10.40±9.41
EMT 100	66.97±15.21	57.35±19.37	14.40±8.95	6.20±5.92
EMT 150	61.30±23.65	56.22±16.41	4.01±4.65	7.60±14.02
EMT 200	76.32±6.35	66.35±15.99	3.60±1.88	5.01±3.17

El análisis de varianza realizado a los tratamientos probados para el extracto metanólico (Fig. 17) dieron diferencia significativa ($p=0.05$) respecto al control negativo (vehículo), lo que indica que todos los tratamientos incrementan los parámetros de TBA y EBA, mismos que están relacionados con una disminución del estado de ansiedad de los ratones. Los mejores resultados se obtuvieron para las dosis de 25, 100 y 200 mg/kg, con porcentajes de TBA de 67.59 ± 13.10 , 66.97 ± 15.21 y 76.32 ± 6.35 respectivamente (Tabla 6), similares a los resultados obtenidos para el control positivo diazepam, 74.06 ± 23.42 . Resultados que colocan al *Haematoxylum campechianum* como una opción importante para el tratamiento de ansiedad.

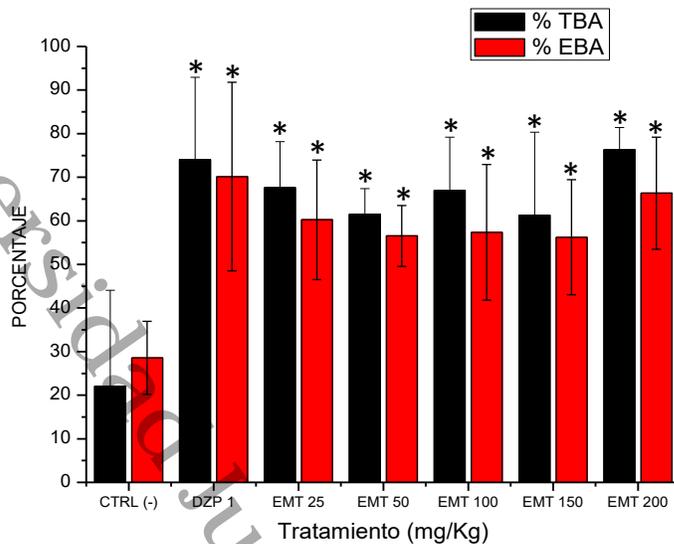


Fig. 17. Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (TBA) y porcentaje de entradas a los brazos abiertos (EBA) en LEC. Prueba realizada administrando vía oral el extracto metanólico del tallo (EMT) de *Haematoxylum campechianum* para dosis de 25 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg. * Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto al control (-) vehículo.

El número de veces que el ratón se asoma para mirar hacia abajo y el número de veces que se levanta sobre sus dos patas en el LEC, indican la motilidad y el grado de ansiedad del individuo. Los resultados obtenidos para estos parámetros muestran que hay una disminución de la motilidad, por lo que se considera que el extracto metanólico (Fig. 18) y acuoso (Fig. 20), así como la sappanchalcona (Fig. 22) aislada de *Haematoxylum campechianum* tienen efecto sedante.

Los tratamientos probados para el extracto metanólico disminuyeron el número de veces que el ratón se asoma y se levanta en dos patas en LEC (Fig. 18), así lo indica el análisis de varianza aplicado a estos parámetros que resultaron con diferencias significativas ($p=0.05$) respecto al control negativo, obteniendo los resultados más bajos para el número de veces que el ratón se levanta en dos patas para las dosis 100, 150 y 200 mg/Kg con 6.20 ± 5.92 , 7.60 ± 14.02 , 5.0 ± 3.17 respectivamente (Tabla 6), que representa una disminución significativa de la motilidad del ratón comparada con el control negativo con 28.80 ± 12.38 . Estos resultados demuestran que el *Haematoxylum campechianum* ejerce efecto sedante, comparable al diazepam (9.20 ± 7.37).

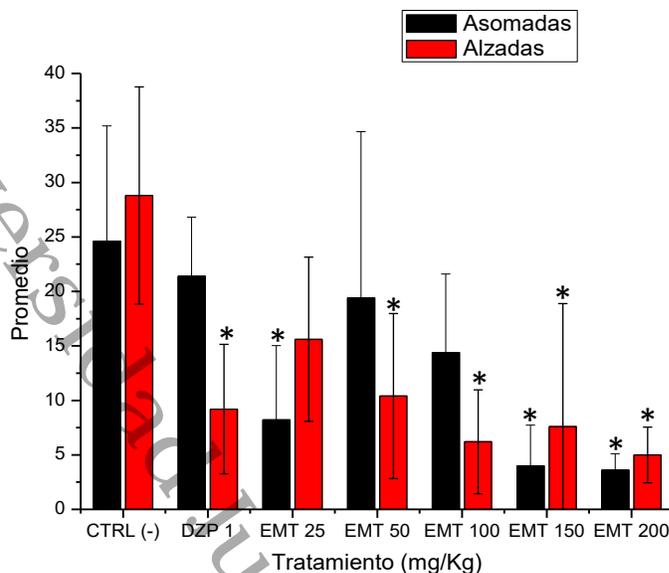


Fig. 18. Número de veces que el ratón se asoma y alza en dos patas en LEC. Prueba realizada administrando vía oral el extracto metanólico del tallo de *Haematoxylum campechianum* para dosis de 25 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg. * Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto al control (-) vehículo.

5.1.2. Resultados de las pruebas LEC para el extracto hidroalcohólico.

Las pruebas realizadas al extracto hidroalcohólico (EEAT) en LEC, mostraron un efecto menor que el observado para el extracto metanólico sobre la disminución de la ansiedad. Los tratamientos con mayor actividad ansiolítica fueron para las dosis de 100 y 200 mg/Kg con porcentajes para TBA de 52.40 ± 22.77 y 66.68 ± 20.64 respectivamente (Tabla 7), similares al efecto ocasionado por el diazepam 74.06 ± 23.42 . El análisis de varianza dio como resultado diferencias significativas para las dosis de 100 y 200 mg/Kg, respecto al control negativo (vehículo), encontrándose como mejor resultado la dosis de 200 mg/Kg del extracto acuoso (Fig. 19).

Tabla 7. Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (TBA) y porcentaje de entradas a los brazos abiertos (EBA) y número de veces que el ratón se asoma y alza en dos patas en LEC. Prueba realizada administrando vía oral el extracto acuoso del tallo (EEATT) de *Haematoxylum campechianum* para dosis de 50 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.

Tratamiento	%TBA	%EBA	Asomadas	Alzadas
Control (-)	22.04 ± 13.13	28.56 ± 10.41	24.60 ± 13.17	28.80 ± 12.38
Diazepam 1	74.06 ± 23.42	70.13 ± 26.41	21.40 ± 6.73	9.20 ± 7.37
EEATT 50	24.28 ± 10.43	18.34 ± 15.41	10.60 ± 4.45	12.40 ± 9.49
EEATT 100	52.40 ± 22.77	48.51 ± 20.59	13.20 ± 5.37	9.60 ± 13.52
EEATT 200	66.68 ± 20.64	65.29 ± 14.04	5.80 ± 2.39	4.60 ± 5.67

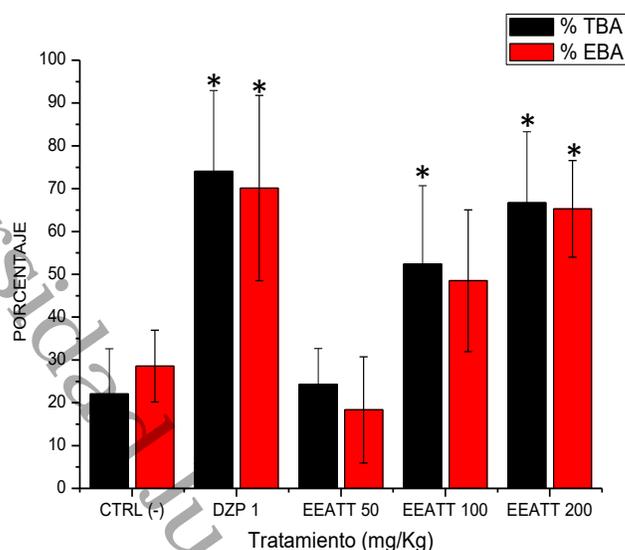


Fig. 19. Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (TBA) y porcentaje de entradas a los brazos abiertos (EBA) en LEC. Prueba realizada administrando vía oral el extracto acuoso del tallo de *Haematoxylum campechianum* para dosis de 50 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.

* Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto al control (-) vehículo.

Todas las dosis probadas en LEC, muestran que el extracto acuoso generó una disminución significativa de la motilidad de los individuos (Fig. 20), resultado que se comprueba con el análisis de varianza realizado a los datos de número de veces que el ratón se asoma y levanta en dos patas, donde se determinó que todos los tratamientos tienen diferencias significativas ($p=0.05$) respecto al control negativo, observándose una disminución mayor de estos parámetros para la dosis de 200 mg/Kg con 5.80 ± 2.39 para el número de veces que el ratón se asoma en los brazos abiertos y 4.60 ± 5.67 para el número de veces que se levanta sobre sus patas, valores menores incluso que los resultados obtenidos para el diazepam que para estos mismos parámetros dio 21.40 ± 6.73 y 9.20 ± 7.37 respectivamente (Tabla 7), lo que indica que el extracto acuoso a 200 mg/Kg tiene mayor efecto sedante que diazepam.

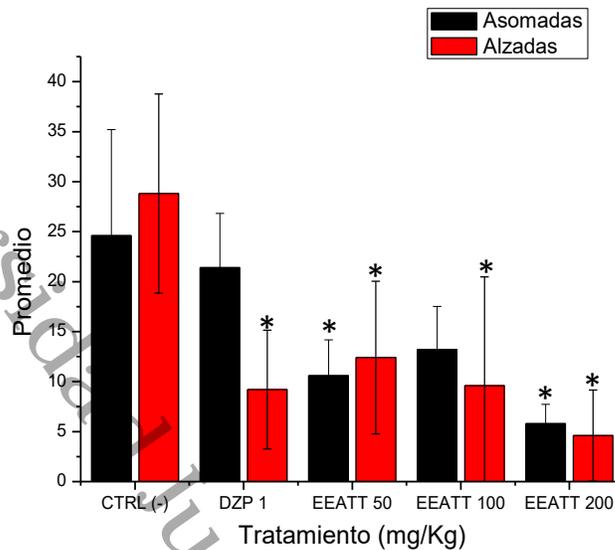


Fig. 20. Número de veces que el ratón se asoma y alza en dos patas en LEC. Prueba realizada administrando vía oral el extracto acuoso del tallo de *Haematoxylum campechianum* para dosis de 50 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg. * Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto al control (-) vehículo.

5.1.3 Resultados de las pruebas LEC para sappanchalcona 1.

Sappanchalcona 1 es un compuesto aislado del extracto metanólico de *Haematoxylum campechianum*, es una chalcona que mostró actividad para el control de la ansiedad de acuerdo con los resultados obtenidos en LEC (Fig. 21). El análisis de varianza para los porcentajes de TBA y EBA, indica que las dosis de 1, 2 y 10 mg/Kg tienen diferencia significativa ($p=0.05$) respecto al control negativo con valores para porcentaje de TBA de 47.42 ± 7.50 , 49.45 ± 14.62 y 60.07 ± 14.28 respectivamente (Tabla 8), revelando un incremento significativo para este parámetro que está relacionado con un efecto de disminución de la ansiedad de los sujetos de prueba. Asimismo, la dosis de 10 mg/Kg de sappanchalcona alcanzó un efecto similar que diazepam (74.06 ± 23.42).

Tabla 8. Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (TBA) y porcentaje de entradas a los brazos abiertos (EBA) y número de veces que el ratón se asoma y alza en dos patas en LEC. Prueba realizada administrando vía oral sappanchalcona **1** aislada del tallo (SPC) de *Haematoxylum campechianum* para dosis de 50 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.

Tratamiento	%TBA	%EBA	Asomadas	Alzadas
Control (-)	22.04±13.13	28.56±10.41	24.60±13.17	28.80±12.38
Diazepam 1	74.06±23.42	70.13±26.41	21.40±6.73	9.20±7.37
SPC 1	47.42±7.50	45.44±11.42	6.80±2.83	8.01±8.50
SPC 2	49.45±14.62	46.78±13.24	15.01±7.80	16.80±9.36
SPC 3	45.75±14.87	45.36±10.58	9.01±4.97	12.60±5.87
SPC 4	34.26±18.47	33.84±14.29	7.80±4.34	20.60±13.40
SPC 10	60.07±14.28	54.76±14.48	9.01±5.27	15.40±15.16

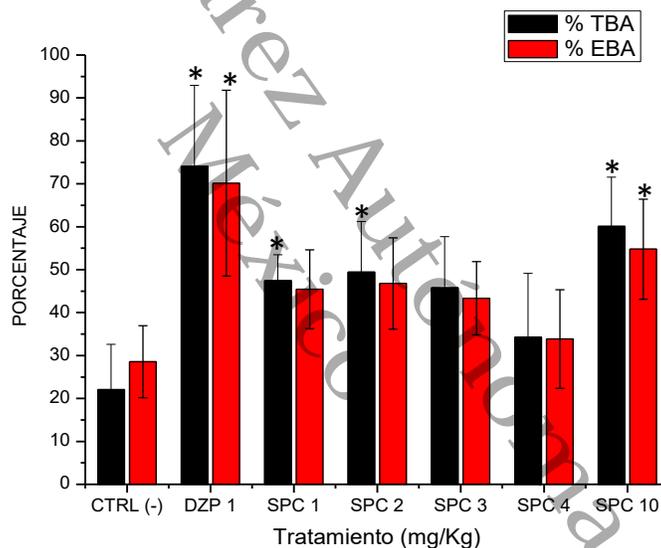


Fig. 21. Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (TBA) y porcentaje de entradas a los brazos abiertos (EBA) en LEC. Prueba realizada administrando vía oral sappanchalcona **1** aislada del tallo de *Haematoxylum campechianum* para dosis de 1 a 10 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.

* Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto al control (-) vehículo.

Las dosis de 1, 3 y 10 mg/Kg de sappanchalcona **1**, disminuyen significativamente la motilidad de los ratones probados en LEC, con valores para el número de veces que el ratón se asoma para mirar hacia abajo de 6.80±2.83, 9.01±4.97 y 9.01±5.27 respectivamente (Tabla 8), mientras que para el control negativo es de 24.60±13.17. El análisis de varianza aplicado a los datos de número de veces que el ratón

se asoma y se levanta en dos patas indica que las dosis de 1, 3, 4 y 10 mg/Kg tienen diferencia significativa ($p=0.05$) respecto al control negativo, con valores para el número de veces que el ratón se asoma, menores a los registrados para diazepam (Fig. 22).

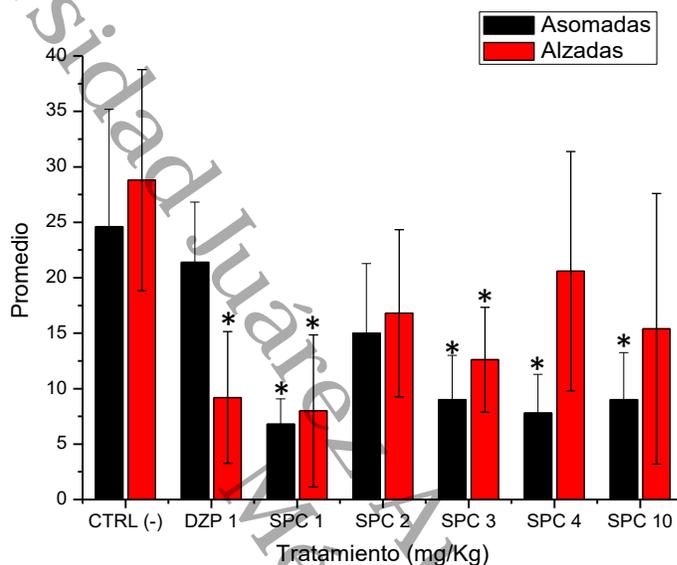


Fig. 22. Número de veces que el ratón se asoma y alza en dos patas en LEC. Prueba realizada administrando vía oral la sappanchalcona **1** aislada del tallo de *Haematoxylum campechianum* para dosis de 1 a 10 mg/Kg comparado con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg. * Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto al control (-) vehículo.

5.2 Prueba de Campo Abierto (CA).

En campo abierto se observó que el extracto metanólico (Fig. 23) ejerce efecto sedante, al disminuir la actividad motora espontánea de los animales. En el extracto acuoso (Fig. 24) el efecto sedante se observa a 100 y 200 mg/Kg, dicha actividad también se observa con 1, 4 y 10 mg/Kg del compuesto aislado sappanchalcona **1** (Fig. 25).

5.2.1 Resultados de las pruebas de CA para el extracto metanólico.

El análisis de varianza indica que todos los tratamientos probados para el extracto metanólico disminuyeron significativamente ($p=0.05$) el número de cruces totales en CA respecto al control negativo, mientras que para el número de veces que el ratón se alza en dos patas, esta diferencia se observa para las dosis de 50 a 200 mg/Kg. Para las dosis de 150 y 200 mg/Kg se obtienen los resultados

más bajos para los tres parámetros medidos (Fig.23), con valores para el número de cruces totales de 37.40 ± 50.12 y 41.00 ± 31.73 respectivamente (Tabla 9), comparados con el control negativo de 143.8 ± 35.70 , y para el diazepam de 111.60 ± 51.80 , lo que demuestra que existe una evidente disminución de la motilidad de los sujetos de prueba, condición que está relacionada con un efecto sedante del extracto metanólico de *Haematoxylum campechianum*.

Tabla 9. Número de cruces totales, cruces por el centro y número de veces que el ratón se alza en dos patas en CA. Prueba realizada administrando vía oral el extracto metanólico del tallo (EMT) de *Haematoxylum campechianum* para dosis de 25 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.

Tratamiento	Cruces Totales	Cruces por el centro	Alzadas
Control (-)	143.80 ± 35.70	10.80 ± 4.92	52.40 ± 18.36
Diazepam 1	111.60 ± 51.80	3.60 ± 1.88	18.80 ± 10.81
EMT 25	82.00 ± 46.34	7.20 ± 6.30	27.60 ± 27.71
EMT 50	77.40 ± 38.54	7.20 ± 7.21	24.00 ± 16.84
EMT 100	77.60 ± 24.97	5.00 ± 4.73	14.80 ± 12.63
EMT 150	37.40 ± 50.12	2.40 ± 3.89	11.40 ± 22.66
EMT 200	41.00 ± 31.73	2.40 ± 2.08	6.20 ± 4.25

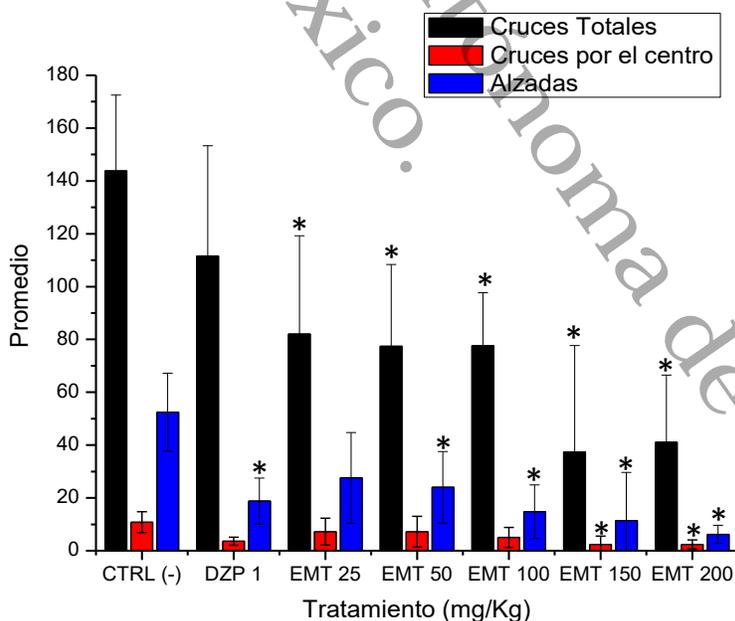


Fig. 23. Número de cruces totales, cruces por el centro y se alza en dos patas en CA. Prueba realizada administrando vía oral el extracto metanólico del tallo de *Haematoxylum campechianum* para dosis de 25 a 200 mg/Kg comparado con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg. * Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto al control (-) vehículo.

5.2.2 Resultados de las pruebas de CA para el extracto acuoso.

El extracto acuoso disminuye significativamente ($p=0.05$) la motilidad de los individuos de prueba (Fig. 24) para las dosis de 100 y 200 mg/Kg con resultados para el número de cruces totales de 83.60 ± 24.90 y 47.60 ± 28.09 respectivamente (Tabla 10), mientras que para el control negativo es de 143.8 ± 35.70 , evidenciando un efecto sedante para el extracto acuoso.

Tabla 10. Número de cruces totales, cruces por el centro y número de veces que el ratón se alza en dos patas en CA. Prueba realizada administrando vía oral el extracto acuoso del tallo (*EEATT*) de *Haematoxylum campechianum* para dosis de 50 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.

Tratamiento	Cruces Totales	Cruces por el centro	Alzadas
Control (-)	143.80 ± 35.70	10.80 ± 4.92	52.40 ± 18.36
Diazepam 1	111.60 ± 51.80	3.60 ± 1.88	18.80 ± 10.81
EEATT 50	89.80 ± 33.01	7.20 ± 7.83	14.60 ± 8.86
EEATT 100	83.60 ± 24.90	11.60 ± 5.87	21.20 ± 18.84
EEATT 200	47.60 ± 28.09	2.60 ± 1.88	8.00 ± 10.02

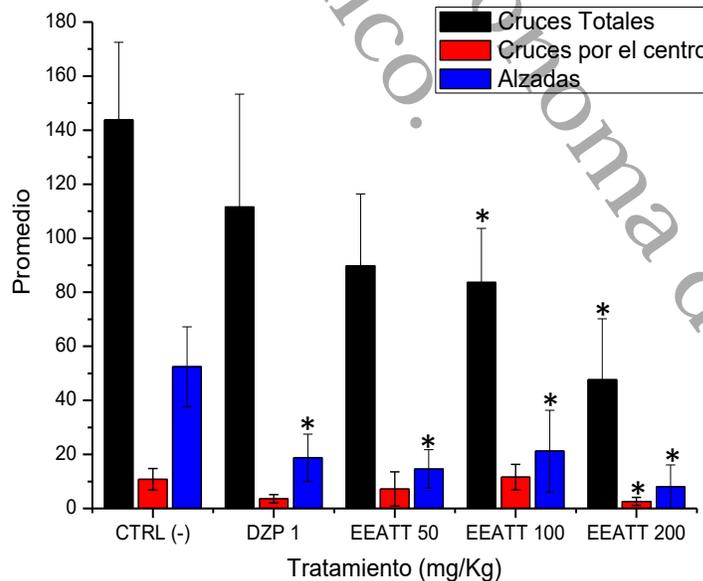


Fig. 24. Número de cruces totales, cruces por el centro y se alza en dos patas en CA. Prueba realizada administrando vía oral el extracto acuoso del tallo de *Haematoxylum campechianum* para dosis de 50 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg. * Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto al control (-) vehículo.

5.2.3 Resultados de las pruebas de CA para sappanchalcona.

Sappanchalcona aislada del extracto metanólico de *Haematoxylum campechianum* mostró disminución significativa ($p=0.05$) de la motilidad de los ratones (Fig. 25) para las dosis de 1, 4 y 10 mg/Kg con resultados para el número de cruces totales de 64.40 ± 36.76 , 84.80 ± 16.73 y 67.40 ± 33.33 respectivamente (Tabla 11), comparados con el control negativo de 143.80 ± 35.70 , incluso los valores son menores a los obtenidos para el diazepam (111.60 ± 51.80). Sin embargo el efecto sedante que ejerce sappanchalcona es menor al observado para el extracto metanólico y acuoso.

Tabla 11. Número de cruces totales, cruces por el centro y número de veces que el ratón se alza en dos patas en CA. Prueba realizada administrando vía oral la sappanchalcona 1 (SPC) aislada del tallo de *Haematoxylum campechianum* para dosis de 50 a 200 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg.

Tratamiento	Cruces Totales	Cruces por el centro	Alzadas
Control (-)	143.80 ± 35.70	10.80 ± 4.92	52.40 ± 18.36
Diazepam 1	111.60 ± 51.80	3.60 ± 1.88	18.80 ± 10.81
SPC 1	64.40 ± 36.76	4.80 ± 6.11	19.00 ± 20.52
SPC 2	115.80 ± 36.41	9.00 ± 8.00	33.40 ± 26.28
SPC 3	129.20 ± 33.12	11.00 ± 4.39	48.80 ± 18.90
SPC 4	84.80 ± 16.73	5.80 ± 3.45	27.00 ± 9.94
SPC 10	67.40 ± 33.33	5.00 ± 3.62	33.20 ± 27.71

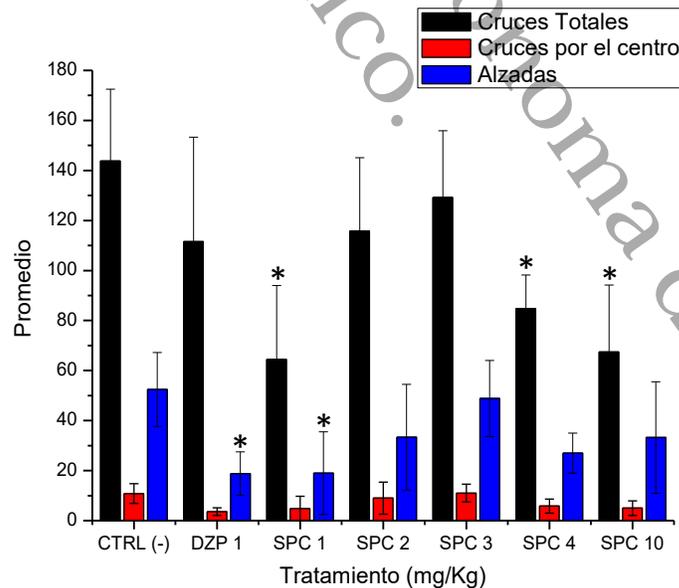


Fig. 25. Número de cruces totales, cruces por el centro y se alza en dos patas en CA. Prueba realizada administrando vía oral la sappanchalcona 1 (SPC) aislada del tallo de *Haematoxylum campechianum* para dosis de 1 a 10 mg/Kg comparados con el control (-) vehículo. El control (+) fue diazepam a 1 mg/Kg. * Diferencia significativa ($p = 0.05$) respecto al control (-) vehículo.

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

CAPÍTULO VI
ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE *Haematoxylum campechianum*.

VI. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE *Haematoxylum campechianum*.

6.1 Identificación de los compuestos aislados.

Sappanchalcona **1** (Fig 26), se aisló como un polvo amarillo, el análisis de los desplazamientos químicos (ppm) de RMN nos permitió establecer su estructura molecular, resultando su fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_5$, y tiene punto de fusión de 166.5 °C. Las señales de 1H y ^{13}C (Tablas 12 y 13), muestran resonancia de 1H , metoxilo (δ_H 3.90), olefina (δ_H 7.37 y 7.49), anillos aromáticos: sistema A'B'X' (δ_H 6.46, 6.52 y 7.57) y sistema ABX (δ_H 6.79, 6.99 y 7.11). El espectro DEPT muestra señales de metoxilo (δ_c 55.8), carbonos olefínicos (δ_c 124.8 y 144.3), carbonilo α , β -insaturado (δ_c 192.5), carbonos aromáticos (δ_c 99.8, 108.7 y 133.4), dos carbonos cuaternarios oxigenados (δ_c 162.5 y 164.4) y carbono cuaternario (δ_c 121.8), anillo aromático ABX (δ_c 114.9, 116.3 y 123.0), dos carbonos cuaternarios oxigenados (δ_c 146.8 y 149.6) y un carbono cuaternario (δ_c 128.7).

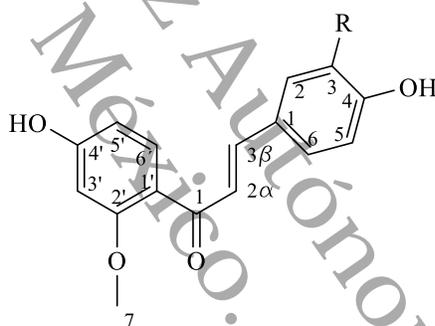


Fig. 26. Sappanchalcona **1** (R= OH); 3-desoxisappanchalcona **2** (R= H).

El espectro HMBC (Fig. 27) permitió establecer la estructura molecular al observar las correlaciones entre los hidrógenos del metoxilo 7 con C2', lo que permitió establecer la posición del metoxilo, asimismo, el hidrógeno del sistema A'B'X' ubicado en C6' correlaciona con el grupo carbonilo α , β -insaturado 1, indicando que este último está conectado al anillo aromático A'B'X', ya que no tiene correlación con los carbonos olefínicos. Por otra parte, el hidrógeno ubicado en el carbono olefínico 3β , correlaciona con C2 del sistema ABX y con el grupo carbonilo α , β -insaturado 1, quedando establecida la posición del grupo olefínico.

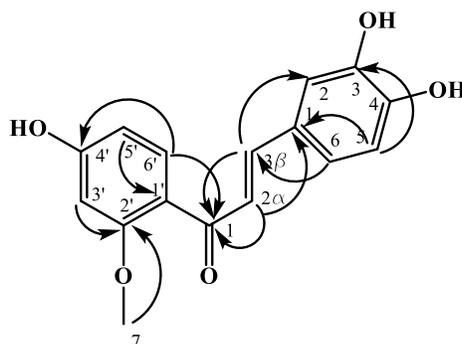


Fig. 27. Correlaciones HMBC (^{13}C , ^1H), en la sappanchalcona **1**.

La 3-desoxisappanchalcona **2** (Fig. 26), se aisló como un polvo naranja, el análisis de los desplazamientos químicos (ppm) de RMN nos permitió establecer su estructura molecular, resultando su fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$, y tiene punto de fusión de $242\text{ }^\circ\text{C}$. Las señales de ^1H y ^{13}C (Tablas 12 y 13), muestran resonancia de ^1H , metoxilo (δ_{H} 3.88), olefina (δ_{H} 7.40 y 7.55), anillos aromáticos: sistema A'B'X' (δ_{H} 6.45, 6.51 y 7.57) y sistema A₂B₂ (δ_{H} 6.81 y 7.49). El espectro DEPT muestra señales de metoxilo (δ_{C} 56.3), carbonos olefínicos (δ_{C} 125.2 y 144.2), carbonilo α , β -insaturado (δ_{C} 193.2), carbonos aromáticos (δ_{C} 100.3, 109.1 y 134.1), dos carbonos cuaternarios oxigenados (δ_{C} 162.6 y 164.6), y carbono cuaternario (δ_{C} 121.8), y sistema A₂B₂ (δ_{C} 117.0, 131.5), carbono cuaternario oxigenado (δ_{C} 161.3), y carbono cuaternario (δ_{C} 128.2).

El espectro HMBC (Fig. 28) muestra correlaciones entre los hidrógenos del metoxilo 7 con C2', lo que permitió establecer la posición del metoxilo, asimismo, el hidrógeno del sistema A'B'X' ubicado en C6' correlaciona con el grupo carbonilo α , β -insaturado 1, indicando que este último está conectado al anillo aromático A'B'X', ya que no tiene correlación con los carbonos olefínicos. Por otra parte, el hidrógeno ubicado en el carbono olefínico 3 β , correlaciona con C2 del sistema A₂B₂ y con el grupo carbonilo α , β -insaturado 1, quedando establecida la posición del grupo olefínico entre el grupo carbonilo y el anillo aromático A₂B₂.

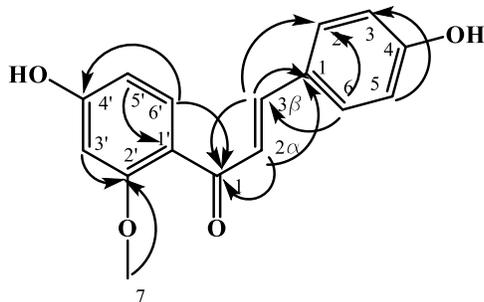


Fig. 28. Correlaciones HMBC (^{13}C , ^1H), en la 3-desoxisappanchalcona **2**.

El tetra acetato de hematoxilol A **3a** (Fig 29), se aisló como un polvo blanco, el análisis de los desplazamientos químicos (ppm) de RMN nos permitió establecer su estructura molecular, resultando su fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$, y tiene punto de fusión de $239\text{ }^\circ\text{C}$. Las señales de ^1H y ^{13}C (Tablas 12 y 13), muestran resonancia de ^1H , metileno (δ_{H} 3.60), oxometileno (δ_{H} 4.50), anillos aromáticos: sistema AB (δ_{H} 7.17, 7.28) y sistema de hidrógenos en posición *para*, dos singuletes (δ_{H} 7.18, 7.20), metilos de acetato (δ_{H} 2.30, 2.35). El espectro DEPT muestra señales metileno (δ_{C} 49.0), oxometileno (δ_{C} 76.9), carbonilo de cetona (δ_{C} 203.6), anillos aromáticos: sistemas AB (δ_{C} 120.6, 126.8), tres carbonos cuaternarios oxigenados (δ_{C} 132.7, 136.5, 149.2), un carbono cuaternario (δ_{C} 131.0) y sistema de carbonos en posición *para* (δ_{C} 125.0, 125.2), dos carbonos cuaternarios oxigenados (δ_{C} 142.1, 144.3), y dos carbonos cuaternarios (δ_{C} 136.3, 142.0); cuatro carbonilos de acetato (δ_{C} 167.9, 168.5, 168.6, 168.7), cuatro metilos de acetato (δ_{C} 20.8, 21.1, 21.1, 21.2).

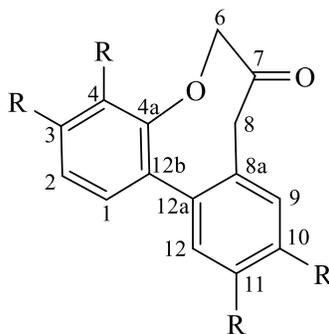


Fig. 29. Hematoxilol A **3**, R=OH; Tetra acetato de hematoxilol A **3a**, R=OAc.

Las correlaciones observadas en el espectro HMBC (Fig. 30) entre los hidrógenos ubicados en C2 con C12b, y de los hidrógenos en C1 con C4a, permitió determinar las posiciones de los carbonos en el sistema AB, asimismo los hidrógenos del oxometileno 6 correlacionan con C4a del sistema AB, por lo que C6 se ubicó junto a dicho anillo aromático, mientras que el hidrógeno ubicado en C9, correlaciona con el metileno C8 y con C12a en el sistema ABX, quedando establecida la posición de C8, vecino a ABX.

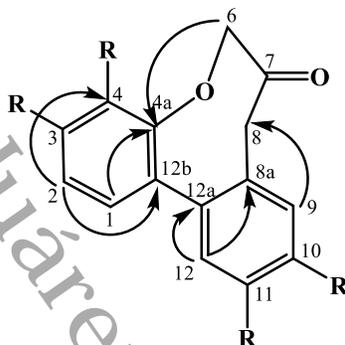


Fig. 30. Correlaciones HMBC (^{13}C , ^1H), en el tetra acetato de hematoxilol A **3a**.

Tetra acetato de 4-*O*-Metilhematoxilol **4a** (Fig. 31), se aisló como un polvo amarillo, el análisis de los desplazamientos químicos (ppm) de RMN nos permitió establecer su estructura molecular, resultando su fórmula molecular $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$, y tiene punto de fusión de 98.2°C . Las señales de ^1H y ^{13}C (Tablas 12 y 13), muestran resonancia de ^1H , un metileno (δ_{H} 2.84 y δ_{H} 3.02), metoxilo (δ_{H} 3.34), oxometino (δ_{H} 3.7), oxometileno (δ_{H} 3.94 y δ_{H} 4.19), anillos aromáticos: sistema AB en (δ_{H} 6.72 y δ_{H} 7.02) y A'B'X' en (δ_{H} 7.14, δ_{H} 7.21 y δ_{H} 7.18), metilos de acetato (δ_{H} 2.3). El espectro DEPT indica un metileno (δ_{C} 38.2), metoxilo (δ_{C} 56.2), metileno oxigenado (δ_{C} 69.4), carbono cuaternario oxigenado (δ_{C} 69.9), oxometino (δ_{C} 76.2), anillos aromáticos: sistema AB (δ_{C} 113.9 y 128.5), tres carbonos cuaternarios oxigenados (δ_{C} 130.9, 143.6 y 146.6), y carbono cuaternario (δ_{C} 118.3) y sistema A'B'X' (δ_{C} 122.9, 125.7 y 129.0), dos carbonos cuaternarios oxigenados (δ_{C} 140.8, 141.6), un carbono cuaternario (δ_{C} 134.3), cuatro carbonilos de acetato (δ_{C} 167.8, 168.25, 168.4, 168.4), cuatro metilos de acetato (δ_{C} 20.3, 20.3, 20.6, 20.6).

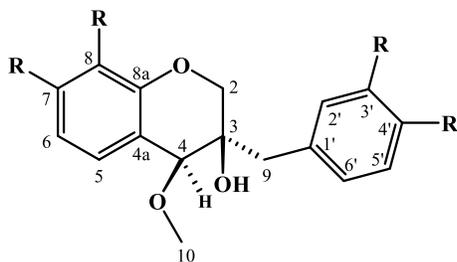


Fig. 31. 4-*O*-metilhematoxilol **4**, R=OH; tetra acetato de 4-*O*-metilhematoxilol A **4a**, R=OAc.

El espectro HMBC (Fig. 32) permitió establecer la estructura molecular al observar las correlaciones entre los hidrógenos del metoxilo C10 con C4, lo que permitió establecer la posición del metoxilo, asimismo, el hidrógeno ubicado en C4 correlaciona con C5, del sistema AB y con el metileno C9, quedando definida la posición de C4. Por otra parte, los hidrógenos ubicados en C9, correlacionan con el oxometileno C2 y con C2' del sistema A'B'X', confirmando la posición de C9 junto al sistema A'B'X'. A su vez el oxometileno C2 correlaciona con C8a del sistema AB y con C4, por lo que se ubicó cercano al sistema AB.

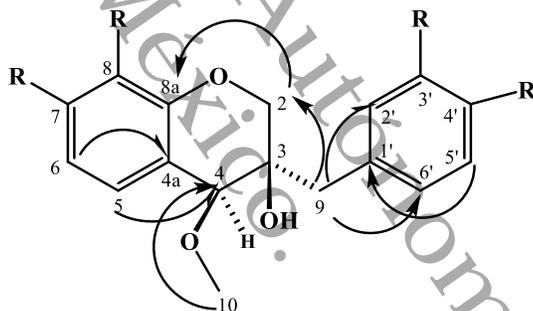


Fig. 32. Correlaciones HMBC (^{13}C , ^1H) en el tetra acetato de 4-*O*-metilhematoxilol A **4a**, R=OAc.

Diacetato de hematoxina **5a** (Fig. 33), se aisló como un polvo amarillo, el análisis de los desplazamientos químicos (ppm) de RMN nos permitió establecer su estructura molecular, resultando su fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$, y tiene punto de fusión de $136.9\text{ }^\circ\text{C}$ Las señales de ^1H y ^{13}C (Tablas 12 y 13), muestran resonancia de ^1H , metileno (δ_{H} 3.09 y 3.40), oxometileno (δ_{H} 3.80 y 4.20), metoxilo (δ_{H} 3.61), oxometino (δ_{H} 3.60), anillo tipo cetoenol α : sistema AB (δ_{H} 6.60 y 7.10) y un anillo aromático: sistema de hidrógenos en posición *para*, dos singuletes (δ_{H} 6.78 y 7.03), metilos de acetato (δ_{H} 2.24, 2.26). El RMN DEPT muestra señales de metileno (δ_{C} 38.7), metoxilo (δ_{C} 62.5), oxometileno (δ_{C} 77.5), carbono cuaternario oxigenado (δ_{C} 70.0), oxometino (δ_{C} 83.7), anillo tipo cetoenol α : sistema AB (δ_{C} 130.2 y 144.2), dos carbonos vecinos a oxígeno (δ_{C} 136.6 y 160.7), carbonilo de cetoenol α (δ_{C} 180.8),

un metino (δ_c 52.7), anillo aromático: sistema de carbonos en posición *para* (δ_c 121.7 y 123.3), dos carbonos cuaternarios oxigenados (δ_c 140.6 y 141.9), dos carbonos cuaternarios (δ_c 130.0 y 133.9), dos carbonilos de acetato (δ_c 168.0, 168.1), dos metilos de acetato (δ_c 20.5, 20.6).

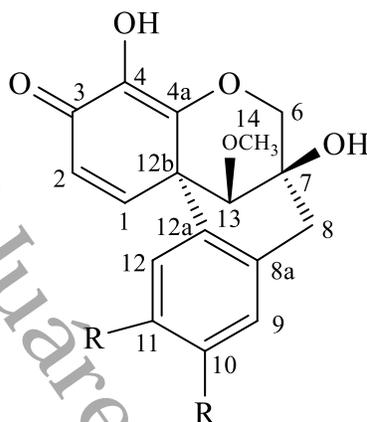


Fig. 33. Hematoxin **5**, R=OH; diacetato de hematoxina **5a**, R=OAc.

En el espectro HMBC (Fig. 34) se observan correlaciones entre los hidrógenos del metoxilo 14 con C13, lo que permitió establecer la posición del metoxilo, asimismo, el hidrógeno ubicado en C13 correlaciona con C1, del anillo tipo cetoenol α y con el oxometileno C6, de esta forma se definió la posición de C13. Por otra parte, los hidrógenos ubicados en C8, correlacionan con el oxometileno C6, C9 y C12a del anillo aromático con hidrógenos en posición *para*, confirmando la posición de C8 junto dicho sistema aromático. A su vez el oxometileno C6 correlaciona con C4a del sistema AB y con C13, por lo que se ubicó cercano al sistema AB.

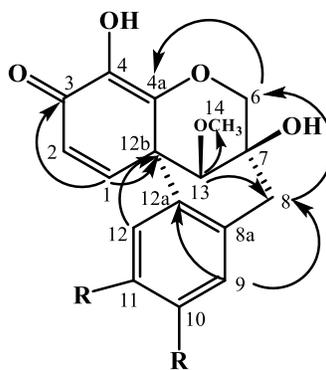


Fig. 34. Correlaciones HMBC (^{13}C , ^1H) en el diacetato de hematoxina **5a**, R=OAc.

El 4-hidroxihematoxil **6** (Fig. 35), es un compuesto nuevo del que no se encontró reporte en la bibliografía. Se aisló como un polvo color ámbar, el análisis de los desplazamientos químicos (ppm) de RMN nos permitió establecer su estructura molecular, resultando su fórmula molecular $C_{16}H_{16}O_6$. Las señales de 1H y ^{13}C (Tablas 12 y 13), muestran resonancia de 1H , un metileno (δ_H 2.76 y δ_H 2.77), oxometileno (δ_H 4.31), oxometileno (δ_H 3.85 y δ_H 4.02), anillos aromáticos: sistema AB en (δ_H 6.55 y δ_H 6.745) y dos sistemas A'B' en (δ_H 6.775 y δ_H 7.125). El espectro DEPT indica un metileno (δ_c 41.0), metileno oxigenado (δ_c 68.3), carbono cuaternario oxigenado (δ_c 71.2), oxometileno (δ_c 70.4), anillos aromáticos: sistema AB (δ_c 110.0 y 121.8), dos carbonos cuaternarios oxigenados (δ_c 134.1 y 146.6), y dos carbonos cuaternarios (δ_c 117.1, δ_c 143.8) y dos sistemas A'X' (δ_c 115.9 y 132.9), un carbono cuaternario oxigenado (δ_c 157.2), un carbono cuaternario (δ_c 128.6).

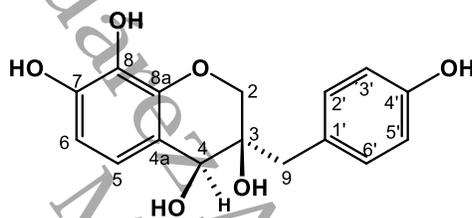


Fig. 35. 3,4,7,8-tetra-ol (3*R*, 4*S*)-3-(4-hidroxi benzil) chromano **6** (4-hidroxihematoxil).

El espectro HMBC (Fig. 36) permitió establecer la estructura molecular al observar las correlaciones entre el hidrógeno ubicado en C4 que correlaciona con C5, en el sistema AB y con el oxometileno C2, quedando definida la posición de C4. Por otra parte, los hidrógenos ubicados en C9, correlacionan con el oxometileno C2, con C2' y C6' del sistema A'B', confirmando la posición de C9 junto al sistema A'B'. A su vez el oxometileno C2 correlaciona con C8a del sistema AB y con C4, por lo que se ubicó cercano al sistema AB.

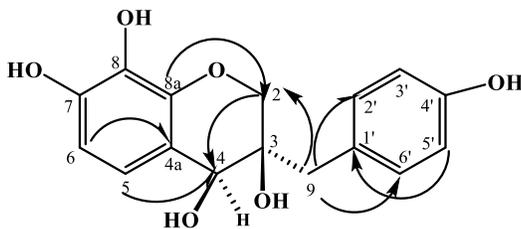


Fig. 36. Correlaciones HMBC (^{13}C , 1H) en el 4-hidroxihematoxil **6**.

Los desplazamientos químicos se establecieron por el análisis de los espectros de 1H , ^{13}C y DEPT. Las interacciones hidrógeno-hidrógeno se determinaron con el espectro COSY, los enlaces carbono e

hidrógeno con HSQC y las correlaciones a dos y tres enlaces se establecieron mediante el espectro HMBC, para obtener las estructuras moleculares propuestas.

Los datos de RMN asignados a las señales de las chalconas: sappanchalcona **1**, 3-desoxisappanchalcona **2** y para los homoisoflavonoides: tetra acetato de hematoxilol **3a** y tetra acetato de 4-*O*-metilhematoxilol **4a**, fueron comparados con los reportados en 2008 (Li-Gen, L., *et al.*, 2008), y los de diacetato de hematoxina **5** con los reportados en 2014 (Ming-Bo, Z; *et al.*, 2014), encontrando resultados similares a los obtenidos en este trabajo.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

6.2 Tablas de desplazamientos químicos para ^1H y ^{13}C .

Tabla 12. Desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C de los compuestos aislados de *Haematophilum campechianum*. Datos obtenidos a 150 MHz, desplazamientos químicos (δ) expresados en ppm. Los compuestos: **1**, **2** y **6** se disolvieron en CD_3OD y **3a-5a** en CDCl_3 , con tetrametilsilano como referencia interna.

Posición	1	2	3a	4a	5a	6
2 α	124.8	125.2				
3 β	144.3	144.2				
1 C=O	192.5	193.2				
1'	121.8	121.8		134.3		128.6
2'	162.5	162.6		125.7		132.9
3'	99.8	100.3		141.6		115.8
4'	164.4	164.6		140.8		157.2
5'	108.7	109.1		122.9		115.9
6'	133.4	134.1		129.0		132.9
1	128.7	128.2	126.8		144.2	
2	114.9	131.5	120.6	69.4	130.2	68.3
3	146.8	117.0	136.5	69.9	180.4	71.2
4	149.6	161.3	132.7	76.2	136.6	70.4
4a			149.2	118.3	160.7	117.1
5	116.3	117.0		128.5		121.8
6	123.0	131.5	76.9	113.9	77.5	110.0
7	55.8	56.3	203.6	143.6	70.0	146.6
8			49.0	130.9	38.7	134.1
8a			142.0	146.6	133.9	143.8
9			125.2	38.2	123.3	41.0
10			142.1	56.2	141.9	
11			144.3		140.6	
12			125.0		121.7	
12a			136.3		130.0	
12b			131.0		52.7	
13					83.7	
14					62.5	
OAc			167.9	167.8	168.0	
OAc			168.5	168.2	168.1	
OAc			168.6	168.4		
OAc			168.7	168.4		
CH ₃			20.80	20.64	20.5	
CH ₃			21.23	20.65	20.6	
CH ₃			21.16	20.3		
CH ₃			21.16	20.3		

Tabla 13. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H de los compuestos aislados de *Haematoxylum campechianum*. Datos obtenidos a 600 MHz, desplazamientos químicos (δ) expresados en ppm, constante de acoplamiento (j) en Hz. Los compuestos: **1**, **2** y **6** se disolvieron en CD_3OD y **3a-5a** en CDCl_3 , con tetrametilsilano como referencia interna.

Posición	1 (δ , j)	2 (δ , j)	3a (δ , j)	4a (δ , j)	5a (δ , j)	6 (δ , j)
2 α	7.37, d, 15.7	7.40, d, 15.7				
3 β	7.49, d, 15.7	7.55, d, 16.5				
2'				7.18, s		7.125, d, 8.4
3'	6.52, d, 2.2	6.51, d, 2.2				
5'	6.46, dd, 2.2, 8.4	6.45, dd, 2.2, 8.4		7.14, d, 8.07		6.775, d, 8.4
6'	7.57, d, 8.4	7.57, d, 8.4		7.21, d, 8.07		7.125, d, 8.4
1			7.28, d, 8.4		7.08, d, 9.9	
2 α	7.11, d, 2.2	7.49, dd, 1.8, 8.4	7.17, d, 8.8	3.94, d, 11.3	6.63, d, 10.2	3.85, d, 10.6
2 β				4.19, d, 11.0		4.02, d, 10.6
3		6.81, dd, 1.8, 8.4				
4				3.70, s		4.30, s
5	6.79, d, 8.0	6.81, dd, 1.8, 8.4		7.02, d, 8.07		6.745, d, 8.4
6 α	6.99, dd, 2.2, 8.0	7.49, dd, 1.8, 8.4	4.50, s	6.72, d, 8.07	3.86, dd, 2.2, 11	6.55, d, 8.07
6 β					4.21, d, 11	
7	3.90, s	3.88, s				
8 α			3.60, s		3.10, d, 16.5	
8 β					3.40, d, 16.1	
9 α			7.20, s	2.84, d, 13.5	7.03, s	2.76, d, 14.31
9 β				3.02, d, 14.3		2.77, d, 13.94
10				3.34		
12			7.18, s		6.78, s	
13					3.60, s	
14					3.60, s	
CH ₃			2.35, s	2.30, s	2.24, s	
CH ₃			2.33, s	2.30, s	2.26, s	
CH ₃			2.30, s	2.30, s		
CH ₃			2.30, s	2.30, s		

Conclusiones

Se aislaron y caracterizaron seis compuestos de los extractos: metanólico y acuoso de *H. campechianum*; dos chalconas conocidas como sappanchalcona **1** y 3-desoxisappanchalcona **2**, tres homoisoflavonas derivadas de polifenoles conocidas como: hematoxilol A **3**, 4-*O*-metilhematoxilol **4**, hematoxina **5** y un compuesto nuevo aislado del extracto acuoso, al cual se le asignó el nombre de 4-hidroxihematoxil **6**. Las estructuras químicas de los metabolitos aislados fueron caracterizadas mediante el análisis de los espectros de RMN en una y dos dimensiones.

En las pruebas de relajación de fleón aislado de cobayo, se determinó que tanto el extracto metanólico como el acuoso del duramen de *Haematoxylum campechianum*, tienen actividad relajante del músculo liso, y para una dosis de 400 µg/ml se alcanzó un porcentaje de relajación de 85.04±2.40 para el metanólico y 78.34±0.5, para el acuoso.

En el extracto metanólico el mejor resultado de relajación se observó en la fracción EMTF6 con una CE₅₀ (µg/mL) de 276.4±47.8 y un porcentaje de relajación máximo de 61.02±4.5, mientras que en el extracto acuoso, la fracción EEATF8, obtuvo la mejor potencia relajante con una CE₅₀ (µg/mL) de 49.96±11.4 y un porcentaje de relajación máximo de 76.14±3.41 similar al de papaverina que se usó como control positivo y que tiene una CE₅₀ (µg/mL) de 36.21±6.55 y un porcentaje de relajación máximo de 76.63±5.14. Para los compuestos aislados de *Haematoxylum campechianum*, el mejor resultado fue el de sappanchalcona **1** con una CE₅₀ (µg/mL) de 257.1±131.4 y un porcentaje de relajación máximo de 50.94±9.58. Los resultados indican que las fracciones del extracto acuoso tienen mayor potencia en la relajación muscular.

En la prueba LEC, se observó que todas las dosis evaluadas del extracto metanólico de *Haematoxylum campechianum* incrementaron los parámetros de porcentaje de TBA y EBA. La dosis de 200 mg/Kg para los extractos metanólico y acuoso de la planta, así como la dosis de 10 mg/Kg de sappanchalcona **1**, incrementaron el parámetro de porcentaje de TBA expresado en segundos, con 76.32±6.35, 66.68±20.64 y 60.07±14.28, respectivamente, similar al efecto que ejerce el diazepam que se utilizó como control positivo y que dio un porcentaje de relajación máximo de TBA de 74.06±23.42.

En campo abierto (CA) se observó que el extracto metanólico y acuoso ejercen efecto sedante, al disminuir la actividad motora espontánea de los ratones. Para la dosis de 200 mg/Kg, los resultados del número de cruces en CA fueron 41.00±31.73 para el extracto metanólico y 47.60±28.09 para el extracto

acuoso, lo que representa, una disminución significativa de la motilidad (alrededor de 70%) respecto al control negativo (vehículo) con 143.8 ± 35.70 . Mientras que para una dosis de 10 mg/Kg para sappanchalcona **1** aislada de *Haematoxylum campechianum*, se obtuvo 64.40 ± 36.76 . Los resultados indican que los extractos metanólico y acuoso, así como sappanchalcona **1** ejercen efecto sedante sobre los sujetos de prueba.

Estos datos indican que la planta tiene una composición química con efecto ansiolítico y sedante, y que la sappanchalcona **1** aislada posee dicha actividad.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

APÉNDICE I
ARTÍCULO PUBLICADO.

Article

Homoisoflavonoids and Chalcones Isolated from *Haematoxylum campechianum* L., with Spasmolytic Activity

Armando Escobar-Ramos ¹, Carlos Ernesto Lobato-García ^{1,*}, Alejandro Zamilpa ², Abraham Gómez-Rivera ¹, Jaime Tortoriello ² and Manasés González-Cortazar ^{2,*}

¹ Academics Division of Basic Sciences, University Juárez Autonomous of Tabasco, Highway Cunduacán-Jalpa Km. 0.5, Cunduacán Tabasco 86690, Mexico; armando.escobar@ujat.mx (A.E.-R.); abgori@gmail.com (A.G.-R.)

² Southern Biomedical Research, Mexican Institute of Social Security, Argentina No. 1, Col. Centro, 62790 Xochitepec, Mexico; azamilpa_2000@yahoo.com.mx (A.Z.); jtortora2@yahoo.es (J.T.)

* Correspondence: carloslobatogarcia@gmail.com (C.E.L.-G.); gmanases2000@gmail.com (M.G.-C.); Tel.: +52-(777)-3-612-155 (M.G.-C.)

Received: 13 July 2017; Accepted: 18 August 2017; Published: 24 August 2017

Abstract: *Haematoxylum campechianum* is a medicinal plant employed as an astringent to purify the blood and to treat stomach problems such as diarrhea and dysentery. A bio-guided chemical fractionation of the methanolic extract obtained from this plant allowed for the isolation of five compounds: two chalcones known as sappanchalcone (1); 3-deoxysappanchalcone (2); three homoisoflavonoids known as hematoxylol A (3); 4-O-methylhematoxylol (4); and, hematoxin (5). The spasmolytic activity was determined in an in vitro model (electrically induced contractions of guinea pig ileum), and allowed to demonstrate that the methanolic extract ($EC_{50} = 62.11 \pm 3.23$) fractions HcF7 ($EC_{50} = 61.75 \pm 3.55$) and HcF9 ($EC_{50} = 125.5 \pm 10.65$) and compounds 1 ($EC_{50} = 16.06 \pm 2.15$) and 2 ($EC_{50} = 25.37 \pm 3.47$) of *Haematoxylum campechianum* present significant relaxing activity as compared to papaverine ($EC_{50} = 20.08 \pm 2.0$) as a positive control.

Keywords: homoisoflavonoids; *Haematoxylum campechianum*; chalcone; spasmolytic

1. Introduction

The Haematoxylon genus (Leguminosae) has two species: *Haematoxylum campechianum* and *Haematoxylum brassileto*. Both are native trees of Central America and belong to the family of the Fabaceae and the subfamily Caesalpinioideae [1]. *H. campechianum* in Mexico is known as the “red wood”, “black wood”, and “Campeche wood” because it originally was found on the shores of the Gulf of Mexico, in the state of Campeche [2]. The heartwood of this tree is an important source for the well-known dye hematoxylin which is a staining agent employed in histology [3–5]; also, the extract from the wood has been used as a sweetener [6]. Traditional medicine refers to the use of the heartwood of this plant for the treatment of depression, kidney disorders, heart problems, toothache, fever, diarrhea, and hemorrhoids [7,8]; and the branches are mainly used to remove toxins [9]. Chemical studies of this plant lead to identifying: hematoxylin, which by oxidation produces hematein [6]; brazilin [10,11], which was also isolated from *Caesalpinia echinata* (Leguminosae); hematoxylol A (3) [6]; protossapanin A and B; sappanchalcone (1); 3-deoxysappanchalcone (2), isolated from *Caesalpinia sappan* L., tetra-

O-methylhematoxylol B [6,12]; and, trimethylether of protosappanin B [6], as well as: hematoxylol, epihematoxylol, 4-O-methylhematoxylol, 4-O-methylepihematoxylol, sappanene, hematoxylene, hematoxylone, hematoxin, epihematoxin, hematoxilol B, and isohematoxylol. It is noteworthy that these compounds showed activity on the inhibition of tyrosine kinase, being hematoxylol, hematoxylol A (3) and epihematoxylol B the most active compounds [13–15]. The flavonoid sapanchalcone which also was isolated from *Caesalpinia sappan* L., has an anti-inflammatory effect in a model of rheumatoid arthritis in mice [16]. However, the biological studies reported so far have only been focused on isolated compounds, but not on extracts and fractions for the heartwood of *H. campechianum*. Our interest is focused on compounds of the flavonoid type because they have been shown to have important biological activity on disorders of the central nervous system [17,18]. The aim of this study was to demonstrate the spasmolytic activity of the methanolic extract. Five fractions (HcF5-HcF9) obtained from the chromatographic separation of this extract exhibited five isolated compounds: two chalcones (compounds 1 and 2) and three homoisoflavonoids structurally derived from hematoxylol (compounds 3, 4 and 5), all of them have been reported previously for this plant [6,11]. The biological model employed was the in vitro electrical stimulation of the isolated ileum of guinea pig. Additionally, all five compounds were characterized by one and two-dimensional NMR.

2. Results and Discussion

2.1. Evaluation of the Ethanolic Extract and Fractions

The results presented in Figure 1 demonstrate that the methanolic extract and the fractions of *H. campechianum* induced a concentration-dependent inhibition of the electrical stimulation induced contractions in guinea pig ileum, using papaverine as a positive control. The values of EC_{50} and E_{max} are presented in Table 1.

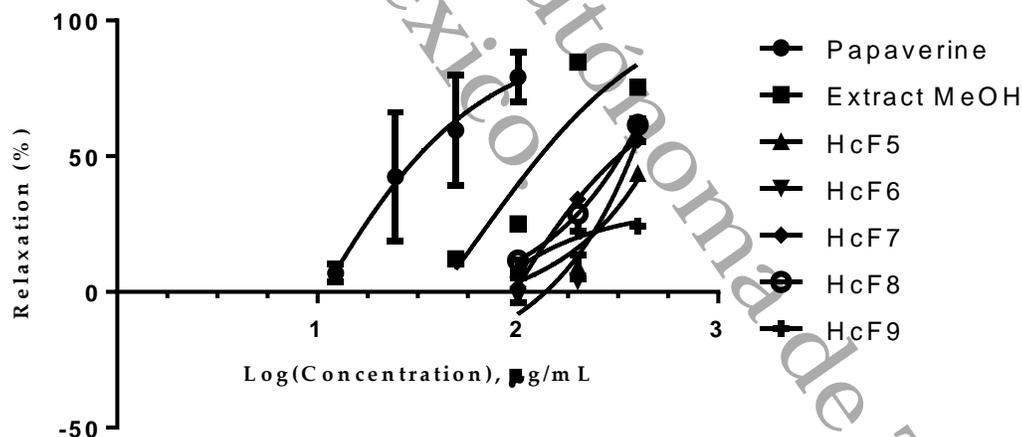


Figure 1. Concentration-response curves of the methanolic extract, HcF5 to HcF9 fractions of *Haematoxylum campechianum* induced contractions in isolated guinea pig ileum compared with papaverine as control (+).

Table 1. Inhibitory effect of the methanolic extract, fractions (HcF5 to HcF9) and compounds (**1–2, 3a–5a**) of *Haematoxylum campechianum* induced contractions in isolated guinea pig ileum (Effective concentration fifty EC₅₀, relaxation E_{max}).

Extract, Fraction and Compounds	Effective Concentration Fifty (CE ₅₀ = µg/mL)	Relaxation (%) E _{max}
Extract MeOH	62.11 ± 3.23 ^b	85.16 ± 6.34 ^d
Fraction		
HcF5	346.7 ± 19.32 ^f	56.7 ± 1.8 ^c
HcF6	324.9 ± 10.15 ^f	80.9 ± 2.5 ^d
HcF7	61.75 ± 3.55 ^b	84.6 ± 1.7 ^d
HcF8	343.7 ± 10.04 ^f	95.1 ± 1.2 ^e
HcF9	125.5 ± 10.65 ^c	24.45 ± 1.6 ^a
Compound		
1	16.06 ± 2.15 ^a	50.9 ± 2.2 ^{b,c}
2	25.37 ± 3.47 ^a	48.5 ± 2.0 ^b
3a	204.5 ± 2.75 ^d	85.78 ± 2.7 ^d
4a	285 ± 11.0 ^e	ND
5a	203.1 ± 7.2 ^d	100 ± 0.3 ^e
Papaverine (+)	20.08 ± 2.0 ^a	85.72 ± 2.8 ^d

* Values are mean ± SD., *n* = 3 independent experiments performed in triplicates, and were determined by linear regression analysis using GraphPad Prism 6.0 Software; ^{a-f} Values are statistically significant at *p* < 0.05. ND = not determined.

The methanol extract obtained by the maceration of the heartwood of *H. campechianum* showed inhibition of the electrically induced smooth muscle contraction (EC₅₀ = 62.11 ± 3.23), which is similar to the HcF7 fraction (EC₅₀ = 61.75 ± 3.55) obtained from the chromatographic separation; whereas, the HcF9 fraction (EC₅₀ = 125.5 ± 10.65) presented the lower activity when compared with papaverine (EC₅₀ = 20.08 ± 2.0). It is noteworthy that both the methanolic extract and the HcF7 fraction showed a similar effect to the one exerted by papaverine, as shown by the comparison of the E_{max} (85.16 ± 6.34 and 84.6 ± 1.7 versus 85.72 ± 2.8). The HcF5, HcF6, and HcF8 fractions showed no significant spasmolytic activity.

2.2. Evaluation of Compounds **1, 2** and **3a–5a**

The results presented in Figure 2 demonstrate that compounds **1** and **2** isolated from the heartwood of *H. campechianum* induced a concentration-dependent inhibition of the electrical stimulation-induced contractions in the guinea-pig ileum, as did the papaverine positive control.

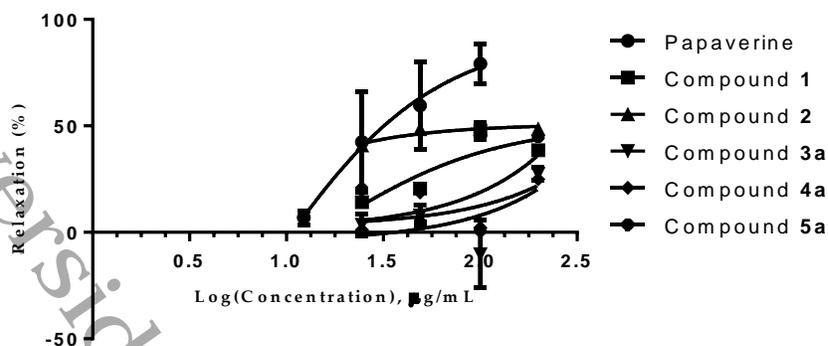


Figure 2. Inhibitory effect of compounds **1**, **2** and **3a–5a**, induced contractions in isolated guinea pig ileum, and compared with papaverine as a control (+).

Chromatographic separation allowed us to isolate five homoisoflavonoids-type compounds; two chalcones known as sappanchalcone (**1**, $EC_{50} = 16.06 \pm 2.15$) and 3-deoxysappanchalcone (**2**, $EC_{50} = 25.37 \pm 3.47$), that presented similar relaxing activity as papaverine ($EC_{50} = 20.08 \pm 2.0$) and hematoxylol A tetraacetate (**3a**, $EC_{50} = 204.5 \pm 2.75$), 4-*O*-methylhematoxylol tetraacetate (**4a**, $EC_{50} = 285 \pm 11.0$), and hematoxin diacetate (**5a**, $EC_{50} = 203.1 \pm 7.2$). It must be noted that compounds **3a**, **4a** and **5a** had no significant relaxing activity (Table 1). These results suggest that the effect produced by the methanolic extract is mainly caused by the chalcones. With this finding, both the biological activity of *H. campechianum*, as well as its use in traditional medicine were demonstrated. However, further studies are required in order to determine the biological activity of this plant for specific diseases, in order to develop treatments focused on solving particular illness.

2.3. Structural Elucidation of Homoisoflavonoids

2.3.1. Sappanchalcone (**1**)

Chromatographic fractionation of HcF6 and HcF7 allowed for the purification of **1** which was obtained as a yellow powder with a melting point of 166.5 °C. The $^1\text{H-NMR}$ spectra of **1** showed three systems; α,β unsaturated double bond system in δ 7.37 (d, 15.7 Hz, H-2 α), and 7.49 (d, 15.7 Hz, H-3 β); aromatic ABX system δ 7.11 (d, 2.2 Hz, H-2), 6.79 (d, 8 Hz, H-5) and 6.99 (dd, 2.2, 8 Hz, H-6); another aromatic ABX system δ 6.52 (d, 2.2 Hz, H-3'), 6.46 (dd, 2.2, 8.4 Hz, H-5') and 7.57 (d, 8.4 Hz, H-6'), and finally an oxygenated base signal at δ 3.9 (s, OCH₃). The methoxyl position was defined unambiguously to be at C-2' (δ 162.5) due to the long-range correlation (HMBC) between protons OCH₃ (δ 3.9, s). On the basis of this information, the natural product was identified as sappanchalcone (**1**). Direct comparison of spectroscopic data (see Tables 2 and 3) from this compound displayed a high similarity with those previously described for 2'-methoxy-3,4,4'-trihydroxychalcone or named sappanchalcone (**1**) [11].

Table 2. $^{13}\text{C-NMR}$ data of homoisoflavonoids **1–5** (**1** and **2** in CD₃OD, **3a–5a** in CDCl₃, 150 MHz).

Position	1	2	3a	4a	5a
2 α	124.8	125.2			
3 β	144.2	144.2			
1 C=O	192.5	193.2			
1'	121.8	121.8		134.3	

2'	162.5	162.6		125.7	
3'	99.8	100.3		141.6	
4'	164.4	164.6		140.8	
5'	108.7	109.0		122.9	
6'	133.4	134.1		129.0	
1	128.7	128.2	126.8		144.1
2	114.9	131.5	120.6	69.4	130.1
3	146.8	117.0	136.5	69.9	180.4
4	149.6	161.3	132.7	76.2	136.6
4a			149.2	118.2	160.7
5	116.2	117.0		128.5	
6	123.0	131.5	76.9	113.9	77.5
7	55.87	56.28	203.6	143.6	70.0
8			49.0	130.9	38.67
8a			142.0	146.6	133.9
9			125.2	38.2	123.3
10			142.1	56.2	141.8
11			144.3	167.7	140.6
12			125.0	168.2	121.7
12a			136.3		130.0
12b			131.0		52.7
13			167.9	168.4	83.75
14			168.5	168.4	62.51
15			168.6	20.64	168.0
16			168.7	20.65	168.0
17			20.80	20.3	20.52
18			21.23	20.3	20.68
19			21.16		
20			21.16		

Table 3. ¹H-NMR data of homoisoflavonoids 1-5 (1 and 2 in CD₃OD, 3a-5a in CDCl₃, 600 MHz, J in Hz).

Position	1	2	3a	4a	5a
2α	7.37, d, 15.7	7.40, d, 15.7			
3β	7.49, d, 15.7	7.55, d, 16.5			
2'				7.18, s	
3'	6.52, d, 2.2	6.51, d, 2.2			
5'	6.46, dd, 2.2, 8.4	6.45, dd, 2.2, 8.4		7.14, d, 8.07	
6'	7.57, d, 8.4	7.57, d, 8.4		7.21, d, 8.07	
1			7.28, d, 8.4		7.08, d, 9.9
2α	7.11, d, 2.2	7.49, dd, 1.8, 8.4	7.17, d, 8.8	3.94, d, 11.3	6.63, d, 10.2
2β				4.19, d, 11.0	
3		6.81, dd, 1.8, 8.4			
4				3.7, s	
5	6.79, d, 8.0	6.81, dd, 1.8, 8.4		7.02, d, 8.07	
6α	6.99, dd, 2.2, 8.0	7.49, dd, 1.8, 8.4	4.5, s	6.72, d, 8.07	3.86, dd, 2.2, 11
6β					4.21, d, 11
7	3.9, s	3.88, s			
8α			3.6, s		3.10, d, 16.5
8β					3.40, d, 16.1
9α			7.2, s	2.84, d, 13.5	7.03, s
9β				3.02, d, 14.3	
10				3.34	
12			7.18, s		6.78, s
13					3.6, s
14					3.6, s
15				2.3, s	
16				2.3, s	
17			2.35, s	2.3, s	2.24, s
18			2.33, s	2.3, s	2.26, s
19			2.3, s		
20			2.3, s		

2.3.2. 3-Deoxysappachalcone (2)

Compound (2) was obtained as an orange powder with a melting point of 242 °C. The NMR spectra of ¹H and ¹³C, showed the same signals as compound (1) (see Tables 1 and 2), except for one of the ABX systems of aromatic rings, which is now AB in 7.49 (dd, 1.8, 8.4 Hz, H-2, H-6), and 6.81 (dd, 1.8, 8.4 Hz, H-3, H-5). Direct comparison of spectroscopic data with those described indicate that this compound corresponds to 2'-methoxy-4,4'-dihydroxychalcone, also known as 3-deoxysappanchalcone (2) [11].

The carbon-hydrogen assignment was performed with HSQC and the correlations at two and three bonds were established using the HMBC spectra (Figure 3).

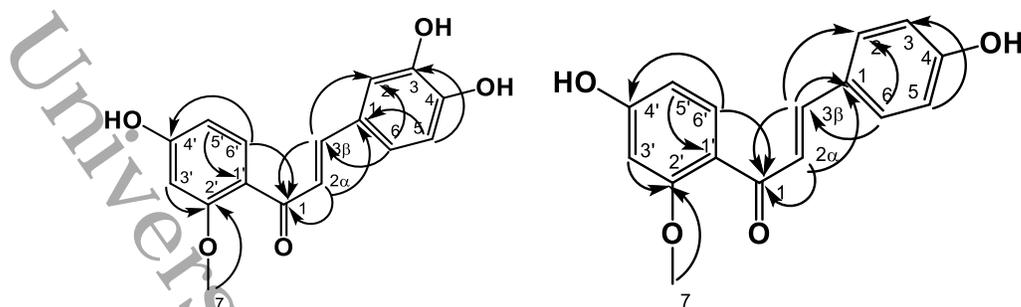
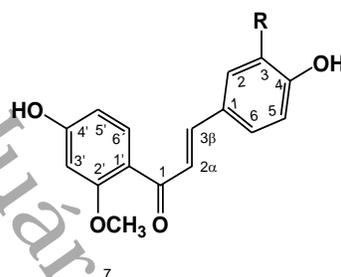


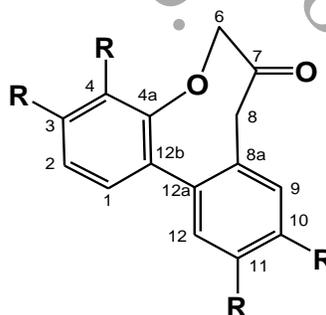
Figure 3. HMBC correlations in compounds 1 and 2.



1 R = OH, Sappanchalcone; 2 R = H, 3-deoxysappanchalcone.

2.3.3. Hematoxylol A Tetraacetate (3a)

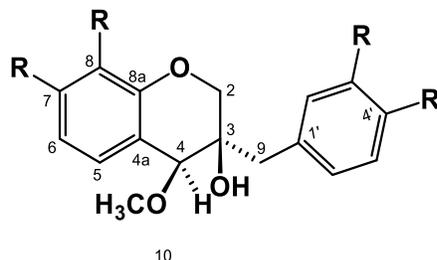
Compound (3) was isolated as a white powder with a melting point of 239 °C. According to the analysis of NMR spectroscopic data (see Tables 2 and 3) and the comparison with data described in the literature, this compound was identified as 3,4,10,11-tetrahydroxy-7,8-dihydroxy-6*H*-dibenz[*b,d*]oxocin-7-one (see Figure 1) on the basis of the DEPT, COSY HSQC, and HMBC spectra of its peracetate derivative (3a), also known as hematoxylol A(3), which had been previously isolated from *Haematoxylum campechianum* and tested as a protein tyrosine kinase inhibitor [6,13].



3 R = OH, Hematoxylol A; 3a R = OAc, Hematoxylol A tetraacetate.

2.3.4. 4-O-Methylhematoxylol Tetraacetate (4a)

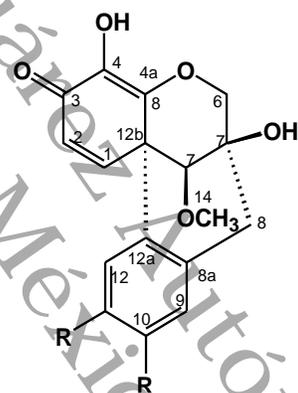
Compound (4) was isolated as a yellow powder with a melting point of 98.2 °C. On the basis of the DEPT, COSY HSQC, and HMBC spectra (see Tables 1 and 2) of its peracetate derivative (4a) and the comparison with data described in the literature this compound was identified as 4-*O*-methylhematoxylol tetraacetate (4a). The natural compound (4) was isolated from *Haematoxylum campechianum* and tested as a protein tyrosine kinase inhibitor [6,13].



4 R = OH, 4-O-methylhematoxylo; 4a R = OAc, 4-O-methylhematoxylool tretaacetate.

2.3.5. Hematoxin Diacetate (5a)

Compound (5) was isolated as a yellow powder with a melting point of 136.9 °C. On the basis of the DEPT, COSY, HSQC, and HMBC spectra (see Tables 1 and 2) of its peracetate derivative (5a), and the comparison with data described in the literature this compound was identified as hematoxin diacetate (5a). The natural compound (5) was isolated from *Haematoxylum campechianum* and tested as a protein tyrosine kinase inhibitor [6,13].



5 R = OH, Hematoxin; 5a R = OAc, Hematoxin diacetate.

3. Materials and Methods

3.1. General Experimental Procedures

Melting points were obtained on a Thermo Scientific IA9000 series melting point apparatus (Electrothermal, Essex, UK) and were left uncorrected. All NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III HD-600 at 600 MHz for ^1H -NMR, NOESY, ^1H - ^1H COSY, HSQC, and HMBC, and 150 MHz for ^{13}C -NMR and DEPT in CDCl_3 , CD_3OD , CD_3COCD_3 and DMSO. Chemical displacements are reported in ppm relative to TMS.

HPLC analysis was performed using a Waters HPLC instrument equipped with Waters 996 UV photodiode array detector (900) set at 280 nm, and employing a packed column SUPELCOSIL LC-F[®] 25 cm \times 4.6 mm, 5 μm , at a flow rate of 0.9 mL/min, and a gradient system of TFA to 0.5%, and H_2O (A:B) as the mobile phase with the following solvent ratios: A:B; 100:0 (0–1 min); 95:5 (2–3 min); 70:30 (4–20 min); 50:50 (21–23 min); 20:80 (24–25 min); 0:100 (26–27 min); and, 100:0 (28–30 min). Total running time of samples was 30 min, with a 10 μL injection. The detection wavelength was scanned at 190–400 nm.

For quantification of the isolated compounds, 5 mg in one milliliter of methanol were dissolved in dilution series of 25, 50, 100 and 200 g/mL.

3.2. Plant Material

The heartwoods of *Haematoxylum campechianum* L. (7.5 kg), were collected in Cunduacán Tabasco, Mexico in February 2016. The voucher specimen of this material (No. 35455) was deposited in the herbarium of Juarez Autonomous University of Tabasco at Villahermosa, Tabasco, México.

3.3. Extraction and Chromatographic Fractionation of Heartwood

The dried and powdered heartwood was successively extracted three times with methanol (14 L, 3 times) for 24 h, at a room temperature. The obtained methanolic extract was evaporated to dryness with a rotary evaporator under reduced pressure (Heidolph G3, Schwabach, Germany), producing a residue of 300 g.

Methanolic extract (200 g) was adsorbed in silica gel and applied to a column of silica gel for gravity (1000 g, 70–230 mesh, Merck). A gradient of dichloromethane/methanol was utilized to elute the column, collecting nine fractions (F1–F9) of 1L each. The fractions were concentrated in a rotary evaporator under a reduced pressure of HcF1(100:0, 1.5 g), HcF2(90:10, 3.8 g), HcF3(80:20, 5.2 g), HcF4(70:30, 3.5 g), HcF5(60:40, 6 g), HcF6(50:50, 13.57 g), HcF7(40:60, 5 g), HcF8(30:70, 17.67 g), HcF9(0:100, 12 g). Fractions 5–9 were evaluated for the inhibition of electrically contractions in ileum isolated from guinea pig.

3.4. Isolated of the Chalcones (1,2) and Homoisoflavonoids Peracetate (3a–5a)

The fractions (HcF6, HcF7 and HcF8) were subjected to a chromatographic fractionation in column. HcF7(4.5 g) was adsorbed and applied to a column of silica gel (175 g, 70–230 mesh, Merck) and eluted with a gradient system with a dichloromethane/methanol with an increase in polarity of 5%, obtaining 35 fractions (HcF7-F1 to HcF7-F14) of 100 mL each. A successive of chromatographic columns in the normal phase of the most active fraction (HcF7-F7), and finally a reverse phase chromatographic column (10 g, RP-18, 40–63 μ m, Merck) with a mobile phase water/acetonitrile in gradient system (samples of 10 mL), allowed the obtainment of the known chalcones 3'-deoxy-sappanchalcone (2, 48.3 mg) and sappanchalcone (1, 50.6 mg). They were identified by NMR (1 H, 13 C, COSY, HSQC, and HMBC).

The fraction HcF8(14 g) was separated using a chromatographic column (10 \times 50 cm) with normal phase silica gel (170 g, 70–230 mesh, Merck) and eluted with a gradient system with dichloromethane/methanol with an increase in polarity of 5%, obtaining 105 fractions (HcF8-F1 to HcF8-F18) of 100 mL each. The 18 fractions were grouped according to their similarity in TLC.

HcF8-F5-6 (2.2 g) was purified under a reverse phase chromatographic column (20 g, RP-18, 40–63 μ m, Merck) and eluted with a mobile phase water/acetonitrile in a gradient system (samples of 12 mL) with an increase of 2%, obtaining 18 fractions F4 (94:6, 251.3 mg), F5 (90:10, 153.7 mg), F6 (88:12, 683 mg). HcF8-F5-6-F6 was purified under a reverse phase chromatographic column (10 g, RP-18, 40–63 μ m, Merck) with a mobile phase water/acetonitrile in a gradient system (samples of 12 mL) that allowed to obtain 12 fractions, among them F5 (88:12, 18.2 mg) and F6 (88:12, 32.2 mg). Fractions F5-F6 and HcF8-F5-6-F4 were chemically derivatized by means of an acetylation reaction. Both were separated using a chromatographic column with normal phase silica gel (10 g, 70–230 mesh, Merck) and eluted with a gradient system with dichloromethane/acetone with an increase in polarity of 2%, and collecting samples of 10 mL, giving the homoisoflavonoids known as 4-O-methylhematoxylol (4a, 13.2 mg) of the fraction HcF8-F5-6-F6-F5-6-F4, and the HcF8-F5-6-F6-F5-6-F8 a hematoxin (5a, 9.8 mg), and hematoxylol A (3a, 134 mg) of the fraction HcF8-F5-6-F4-F1. They were identified by NMR (1 H, 13 C, COSY, HSQC, and HMBC). Compounds 1, 2 and 3a–5a, were evaluated for the inhibition of electric contractions in ileum isolated from guinea pig.

3.5. Reaction of Acetylation

Fractions HcF8-F5-6-F4 (251 mg) and HcF8-F5-6-F6-F5-6 (50.4 mg), were treated with Ac₂O (3 mL) and pyridine (1 mL) for 2 h [19]. The reaction was stopped with ice (2 g), and ethyl acetate (50 mL) was added, forming two phases (AcOEt and water). Phase of AcOEt was concentrated in rotary evaporator to give of HcF8-F5-6-F6-F5-6 and HcF8-F5-6-F4. These fractions were purified by column chromatography to give compounds (**3a**, **4a** and **5a**). The structures of these compounds were identified on the basis of 1D and 2D NMR techniques, and by comparison with literature data [6,11,13]. See data as supplement Figures S1–S25.

3.6. Model of Ileum Isolated Guinea Pigs

To evaluate the spasmolytic activity, the experimental model of electrically induced guinea pig isolated ileum was performed. Guinea pigs of either sex (250–500 g) were used and subjected to cervical dislocation. Ethical guidelines for the handling and slaughter of experimental animals indicated by the American Veterinary Medical Association (AVMA, 2001) were followed.

(Official Mexican Standard NOM-062-ZOO-1999). Their abdomens were opened. Their ileum were removed and maintained in Petri dishes containing Tyrode's solution, and constantly aerated with carbogen gas (O₂ 95%, CO₂ 5%). Portions of about 1.5 cm length of the tissue were mounted in a set of 3 mL chambers. One end of the tissue was attached to the bottom of the chamber to an electrode while the other was attached with a silk thread to a force transducer, which was connected to an acquisition system (PanLab, BIOPAC Systems, Goleta, CA, USA). After 30 min of an adaptation period, the tissue was electrically stimulated (25 V, 5 mS, 1 Hz, 5 S, every 2 min; with a Grass stimulator) by isolated tungsten electrodes connected to the end of the tissue. Induced contractions were recorded and after homogeneous response, different concentrations of drugs under study were added into the chamber, and the ability for inhibiting the electrically induced contraction was evaluated [20]. The positive control used was papaverine.

The Tyrode's solution (Krebs-Henseleit) was prepared as follows in mM: NaCl (137), C₆H₁₂O₆ (5), NaHCO₃ (11.9), CaCl₂·2H₂O (2.7), KCl (5.4), MgCl₂·6H₂O (0.5), γ NaH₂PO₄·H₂O (0.45) and diluted to a volume of 2 L with distilled water. The pH was adjusted to 7.4.

3.7. Preparation of Extracts, Fractions and Compounds for Evaluations

The methanolic extract, fractions, and compounds were diluted in Tyrode's solution and PVP (polyvinylpyrrolidone, 1:2) for the less polar.

3.8. Statistical Analysis

The effect in this model was expressed as the mean ± standard deviation (SD). From $n = 3$ independent experiments were performed in triplicates, and were determined by linear regression analysis using GraphPad Prism 6.0 Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The values of the mean effective concentrations (EC₅₀) and maximum effects (E_{max}) were obtained from the concentration-response curves. The data were analyzed by a one-way ANOVA and the Tukey test. Differences between the means were considered to be significant when $p < 0.05$.

4. Conclusions

Five compounds of *H. campechianum* methanolic extract were isolated and characterized: two chalcones known as sappanchalcone (**1**), 3'-deoxy-sappanchalcone (**2**), three homoisoflavonoids derivatized known as hematoxylol A (**3a**), 4-O-methylhematoxylol (**4a**), and hematoxin (**5a**). The correct structures were assigned by detailed spectroscopy analysis of NMR in one and two dimensions. The most bioactive chalcones **1** and **2** were isolated from the spasmolytic fraction (Hc-F7). In the biological test in vitro, extract, fractions, and compounds **1** and **2**. These results validate the traditional use of this plant.

Supplementary Materials: The following are available online, Figures S1–S25.

Acknowledgments: This work is a doctoral thesis of the teacher Armando Escobar Ramos of the University Juárez Autonomous of Tabasco within the postgraduate of sciences. We are grateful to Red Temática de Farmoquímicos (CONACYT), L.Q. Gerardo Velázquez López for NMR analysis and Miguel Alberto Magaña Alejandro for taxonomically identification (Herbarium of UJAT). Zamilpa, A, thanks Fundación IMSS for economical support. Special thanks to Arturo Perez and Jonathan Orduño for their technical assistance.

Author Contributions: A.E.-R., M.G.-C. and C.E.L.-G. conceived and designed the biological experiments; A.E.-R., J.T. and M.G.-C., performed the experiments; A.E.-R., C.E.L.-G., M.G.-C. and A.Z. analyzed the chemical data and chromatographic analysis; M.G.-C., A.G.-R., J.T. and A.Z. contributed reagents/materials/analysis tools and statistical analysis; A.E.-R., M.G.-C. and C.E.L.-G. wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Yasunaka, K.; Abe, F.; Nagayama, A.; Okabe, H.; Lozada-Pérez, L.; López-Villafranco, E.; Estrada-Muñiz, E.; Aguilar, A.; Reyes Chilpa, R. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 293–299.
2. Durán, R.; Méndez, M. *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán; Centro de Investigación Científica de Yucatán: Mérida, Mexico 2010; Volume 7*, pp. 370–372.
3. Norton, S. The useful plants of dermatology. II. Haematoxylin and hematoxylin. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1996**, *34*, 149–151.
4. Mazzuco, G.; Basolo, B.; Monga, G. The use of mallory's phosphotungstic acid-hematoxylin (PTAH) stain in renal pathology. *Pathol. Res. Pract.* **1982**, *175*, 380–391.
5. Waldeyer, W. Untersuchungen über den Ursprung und den Verlauf des Axencylinders bei Wirbellosen und Wirbelthieren sowie über dessen Endverhalten in der quergestreiften Muskelfaser. *Henle Pfeifer's Z. Rat. Med.* **1863**, *20*, 193/256.
6. Masuda, H.; Ohtani, K.; Mizutani, K.; Ogawa, S.; Kasai, R.; Tanaka, O. Chemical study on *Haematoxylin campechianum*: A sweet principle and new dibenz[*b,d*]oxocin derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 1382–1384.
7. Maldonado, F. *Flora Medicinal del Estado de Tabasco: Uso, Manejo y Conservación*; Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT): Villahermosa, Mexico, 2005; p. 97.
8. Martínez, M. *Las Plantas Medicinales de México Tomo 1*; Editorial Botas: Distrito Federal, México, 2005; Volume 386, pp. 234–235.
9. Gómez-Méndez, E.; López-Noverola, U.; López-Naranjo, J.; Salaya-Domínguez, J.; Díaz-González, J.; Hernández, M. *Catálogo de Plantas Medicinales de Uso Actual del Estado de Tabasco*; Fundación Produce Tabasco A.C., Universidad Juárez Autónoma del Estado de Tabasco Villahermosa: Villahermosa, Mexico, 2004; p. 55.
10. Perkin, W.; Robinson, R. Brazilin and Haematoxylin. Part VII. Synthesis of derivatives of hydrindene closely allied to Brazilin and Haematoxylin. *J. Chem. Soc. Trans.* **1907**, *91*, 1073–1103.
11. Namikoshi, M.; Nakata, H.; Nuno, M.; Ozawa, T.; Saitoh, T. Homoisoflavonoid and Related Compounds. III. Phenolic Constituents of *Caesalpinia Japonica* SIEB. et ZUCC. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 3568–3575.
12. Masahiro, N.; Seiji, N.; Shu-Mei, L.; Ikuyo, E.; Ken-Ichi, K. Protosappanin A, a novel biphenyl compound from *Sappan Lignum*. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 1–6.
13. Lin, L.G.; Xie, H.; Li, H.L.; Tong, L.J.; Tang, C.P.; Ke, C.Q.; Liu, Q.F.; Lin, L.P.; Geng, M.Y.; Jiang, H.; et al. Naturally occurring homoisoflavonoids function as potent protein tyrosine kinase inhibitors by c-Src-based high-throughput screening. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4419–4429.
14. Liu, L.G.; Liu, Q.Y.; Ye, Y. Naturally occurring homoisoflavonoids and their pharmacological activities. *Planta Med.* **2014**, *80*, 1053–1066.
15. Zhao, M.B.; Li, J.; Shi, S.P.; Cai, C.Q.; Tu, P.F.; Tang, L.; Zeng, K.W.; Jiang, Y. Two new phenolic compounds from the Heartwood of *Caesalpinia sappan* L. *Molecules* **2014**, *19*, 1–8.

16. Jung, E.G.; Han, K.I.; Kwon, H.J.; Patnaik, B.B.; Kim, W.J.; Hur, G.M.; Namm, K.W.; Han, M.D. Anti-inflammatory activity of sappanchalcone isolated from *Caesalpinia sappan* L. in a collagen-induced arthritis mouse model. *Arch. Pharm. Res.* **2015**, *38*, 973–983.
17. Hanrahan, J.R.; Chebib, M.; Johnston, G.A. Flavonoid modulation of GABAA receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *163*, 234–245.
18. Grosso, C.; Valentao, P.; Ferreres, F.; Andrade, P.B. The use of flavonoids in Central Nervous System Disorders. In *Current Medicinal Chemistry*; Atta-ur-Rahman, Ed.; Bentham Science Publishers: Cambridge, UK, 2013; Volume 20, pp. 4694–4719.
19. Cheng, S.Y.; Wang, C.M.; Cheng, H.L.; Chen, H.J.; Hsu, Y.M.; Lin, Y.C.; Chou, C.H. Biological activity of oleanane triterpene derivatives obtained by chemical derivatization. *Molecules* **2013**, *18*, 13003–13019.
20. Lozoya, X.; Becerril, G.; Martínez, M. Modelo de perfusión intraluminal del íleon del cobayo in vitro en el estudio de propiedades antidiarréicas de la guayaba (*Psidium guajava*). *Arch. Investig. Méd.* **1990**, *21*, 155–162.

Sample Availability: Samples of the compounds **1**, **2** and **3a–5a** are available from the authors.



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

APÉNDICE II
ESPECTROS DE RMN.

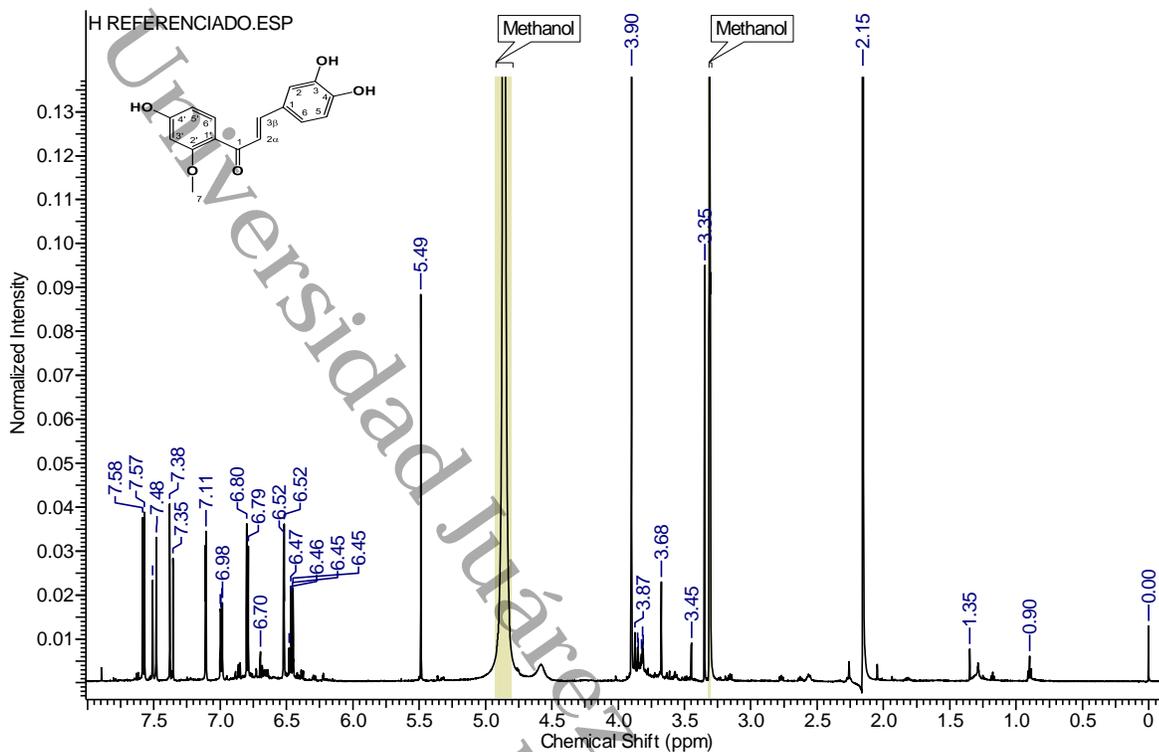


Fig. 1A RMN DE ^1H (CD_3OH , 600 MHz). Compuesto (1).

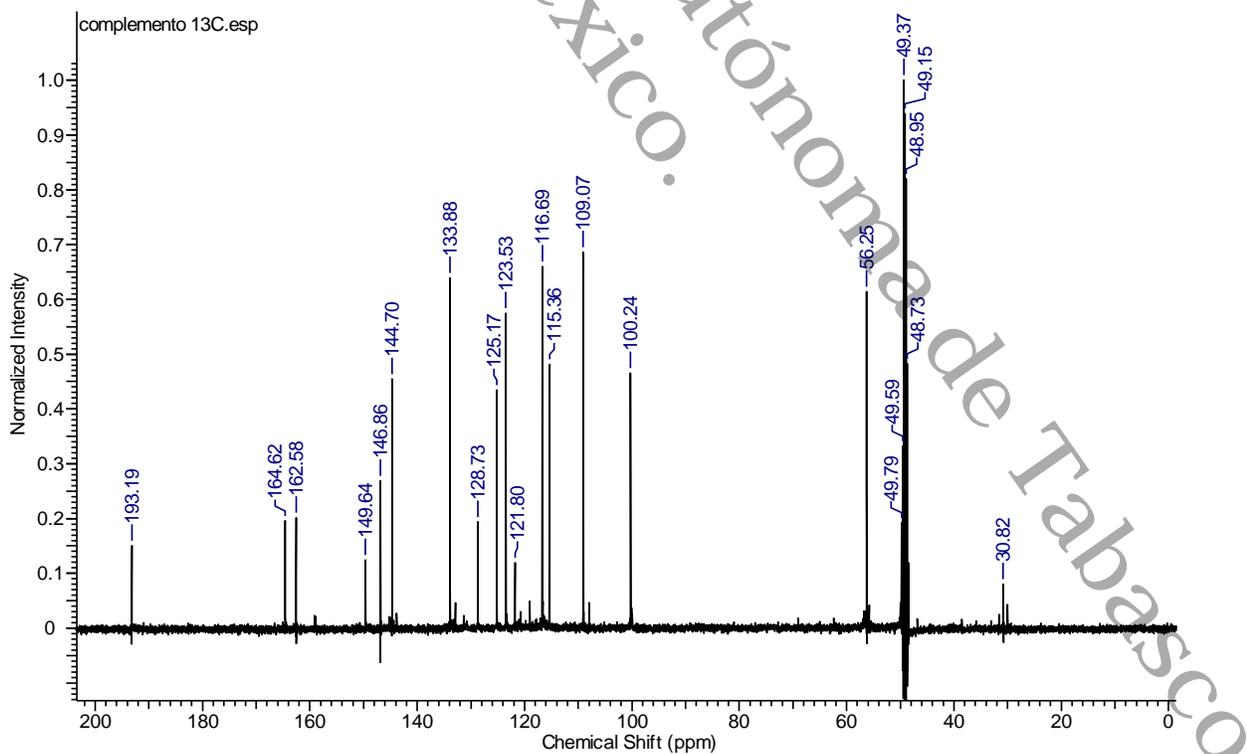


Fig. 2A RMN DE ^{13}C (CD_3OH , 600 MHz). Compuesto (1).

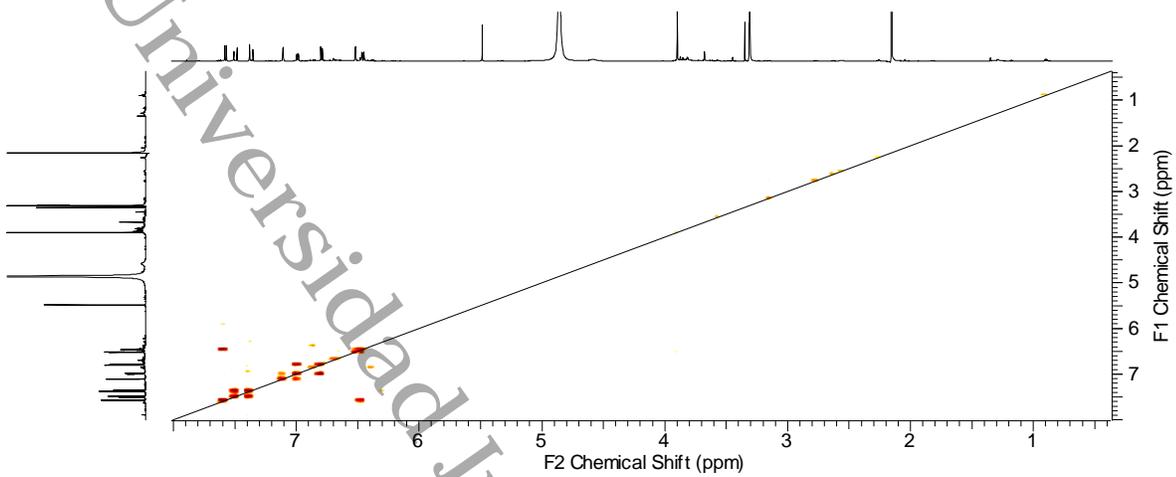


Fig. 3A COSY (CD₃OH, 600 MHz). Compuesto (1).

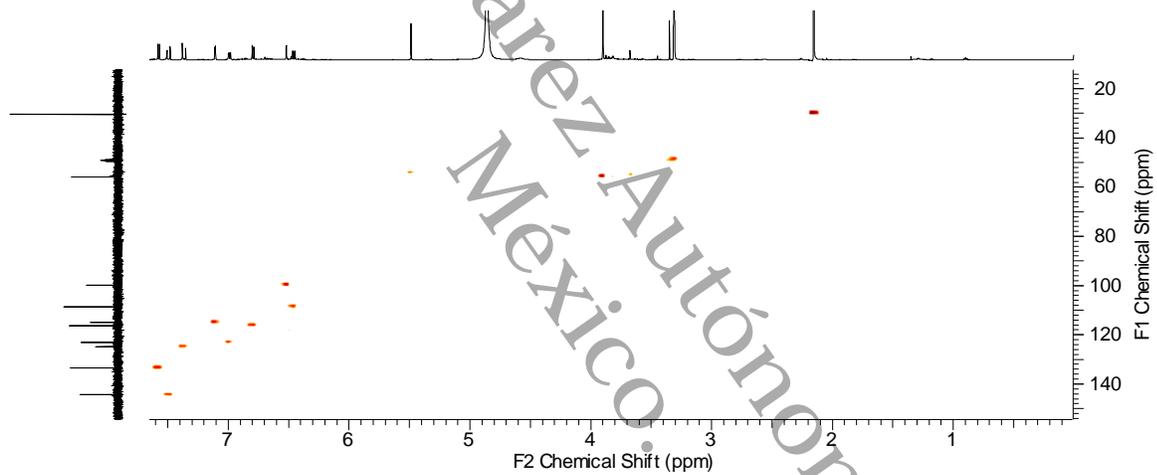


Fig. 4A HSQC (CD₃OH, 600 MHz). Compuesto (1).

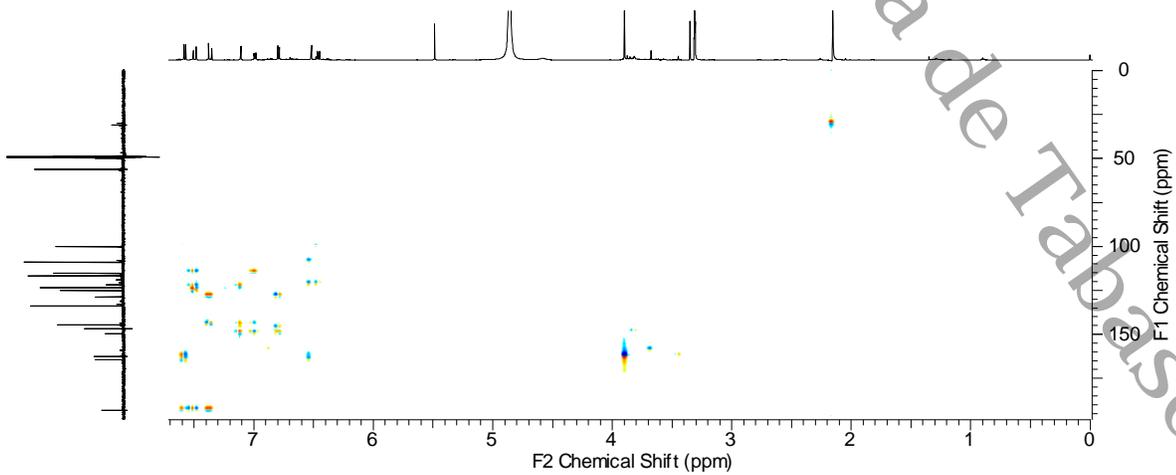


Fig. 5A HMBC (CD₃OH, 600 MHz). Compuesto (1).

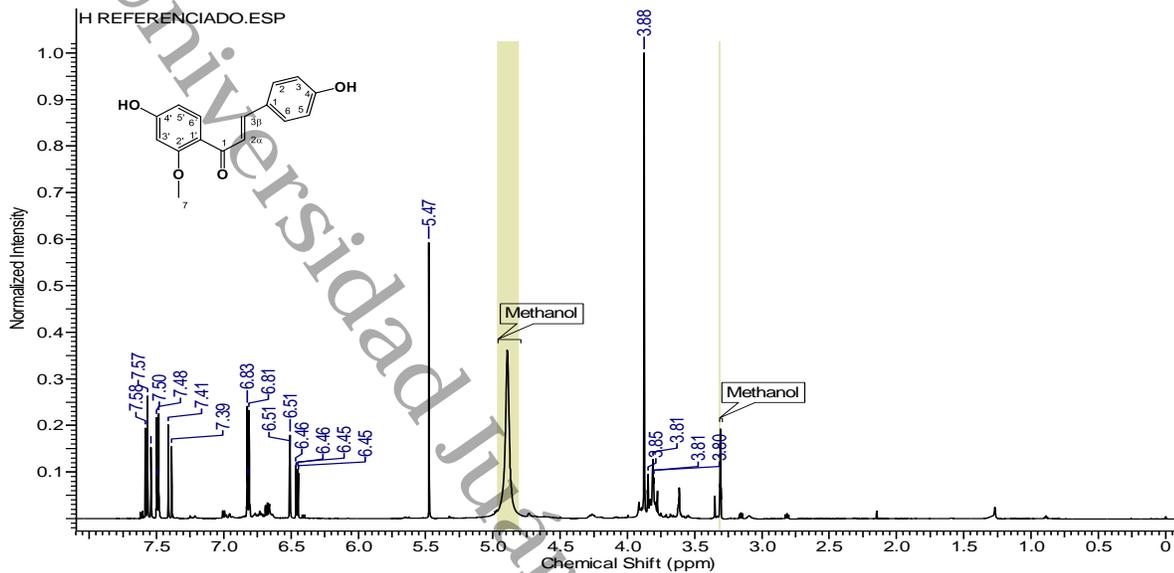


Fig. 6A RMN DE ^1H (CD_3OH , 600 MHz). Compuesto (2).

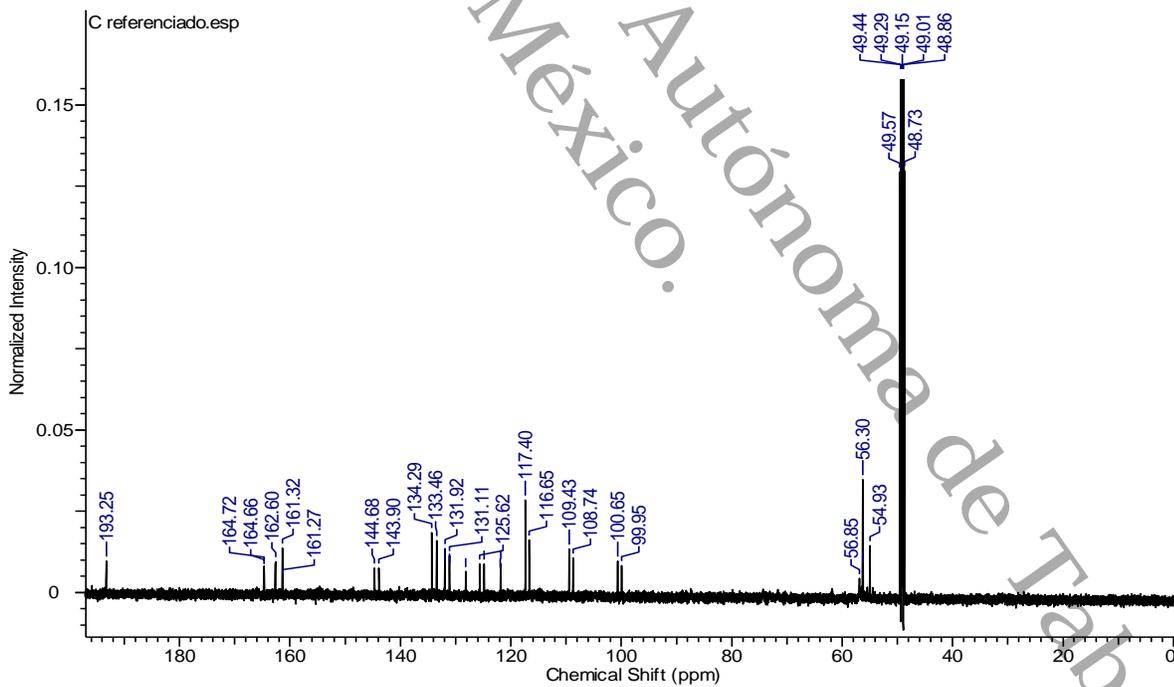


Fig. 7A RMN DE ^{13}C (CD_3OH , 600 MHz). Compuesto (2).

Fig. 7A Fig.

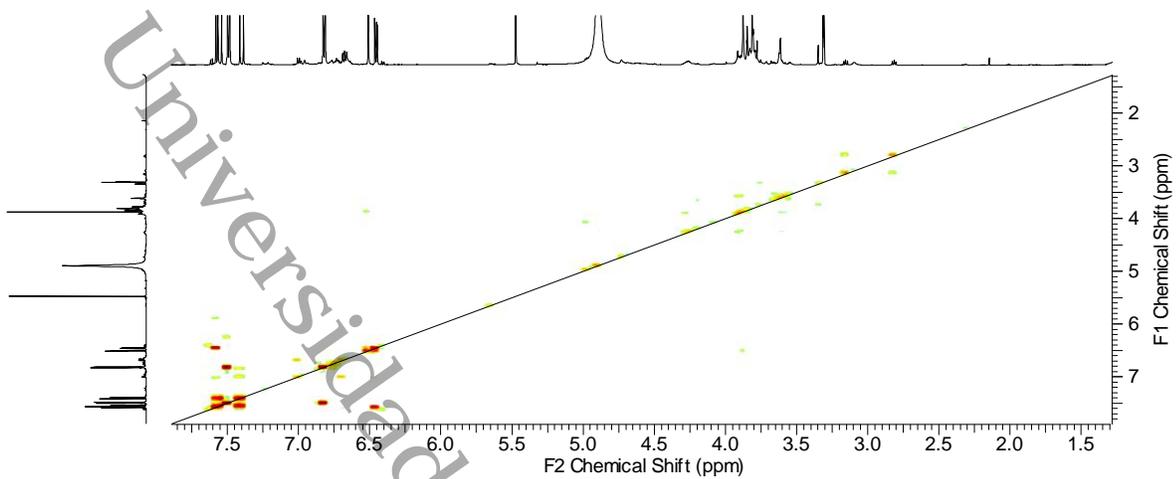


Fig. 8A COSY (CD₃OH, 600 MHz). Compuesto (2).

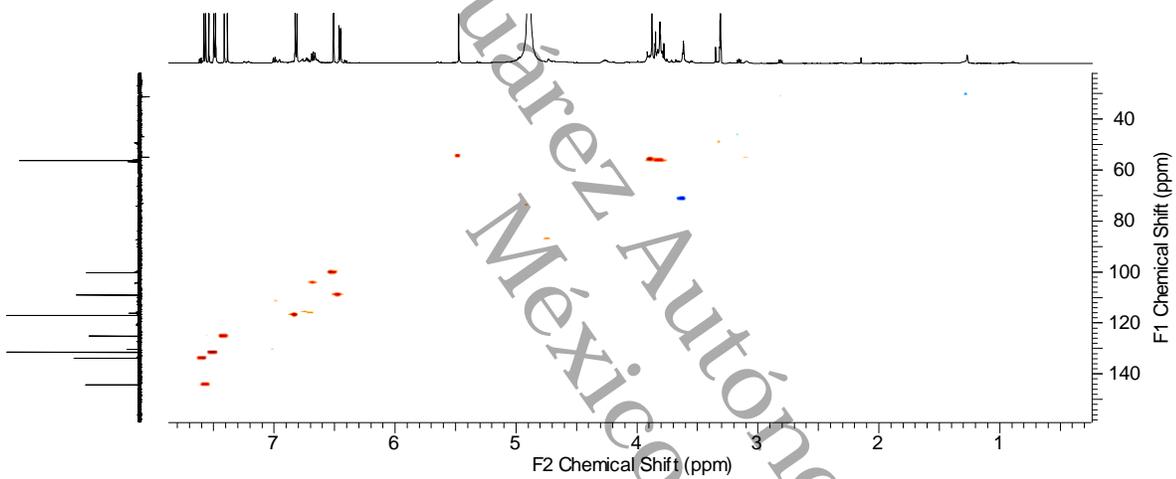


Fig. 9A HSQC (CD₃OH, 600 MHz). Compuesto (2).

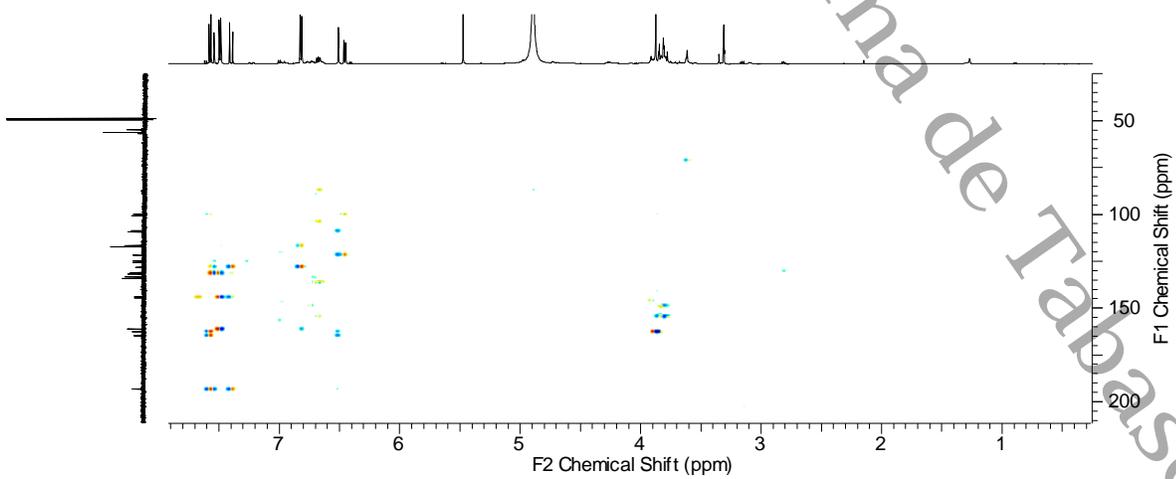


Fig. 10A HMBC (CD₃OH, 600 MHz). Compuesto (2).

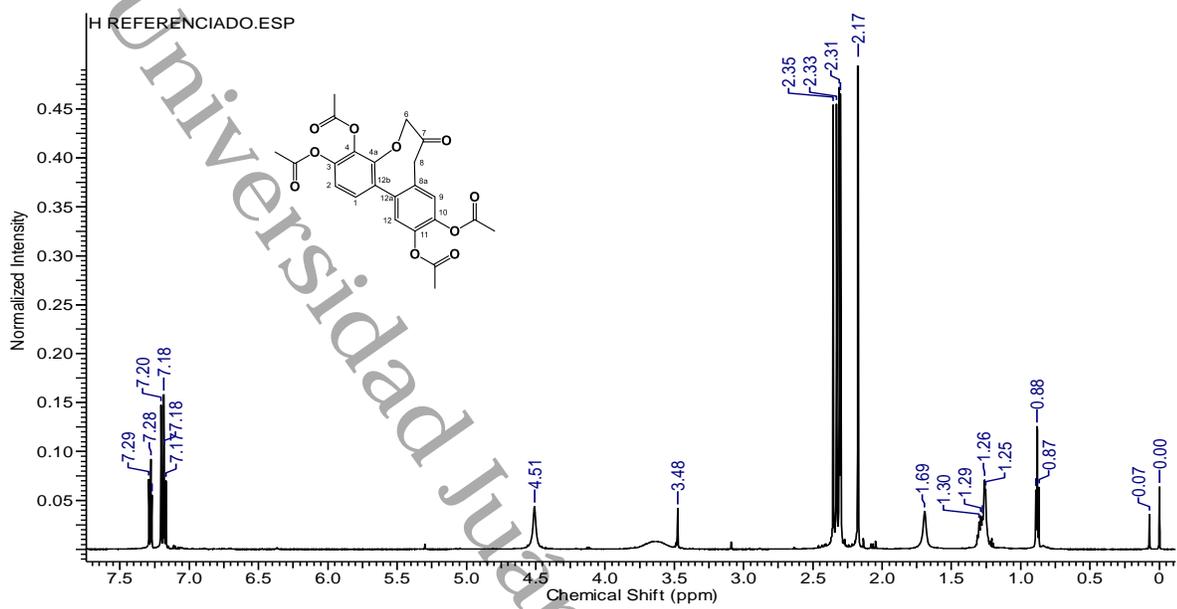


Fig. 11A RMN DE ^1H (CDCl_3 , 600 MHz). Compuesto (**3a**).

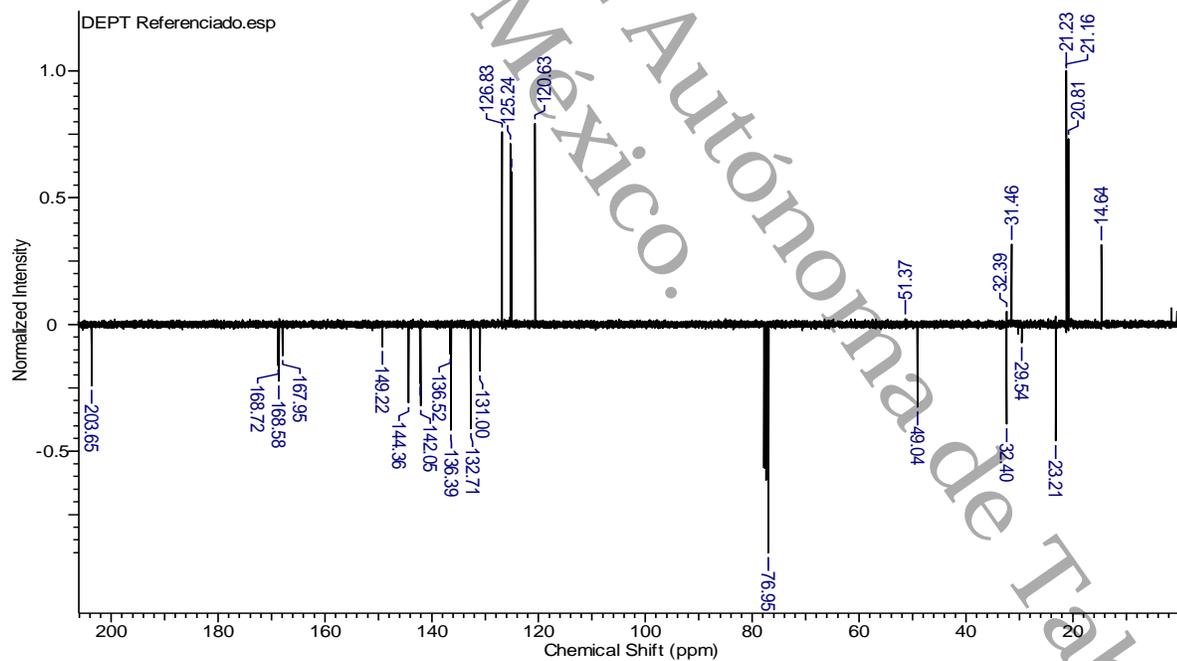


Fig. 12A DEPT (CDCl_3 , 600 MHz). Compuesto (**3a**).

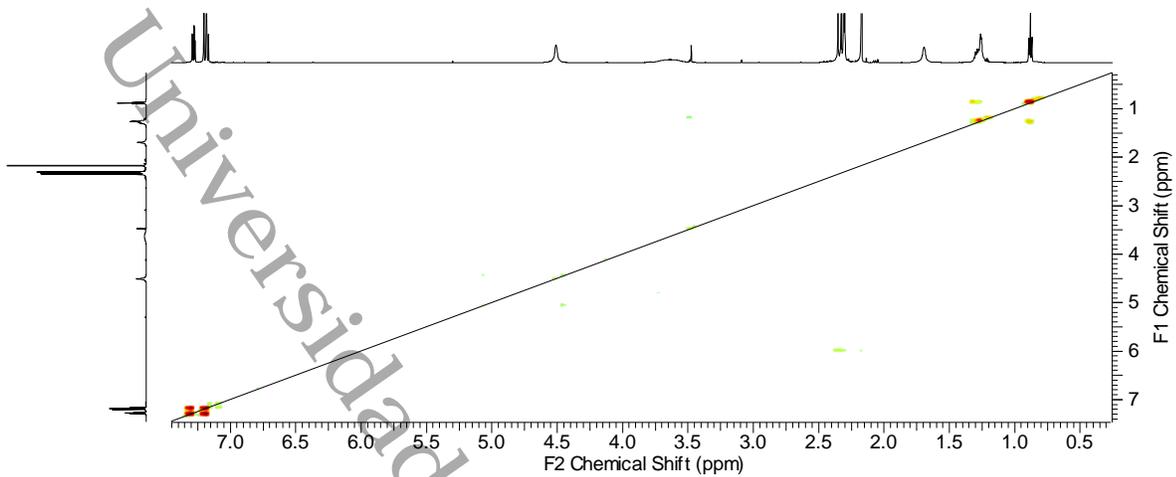


Fig. 13A COSY (CDCl₃, 600 MHz). Compuesto (3a).

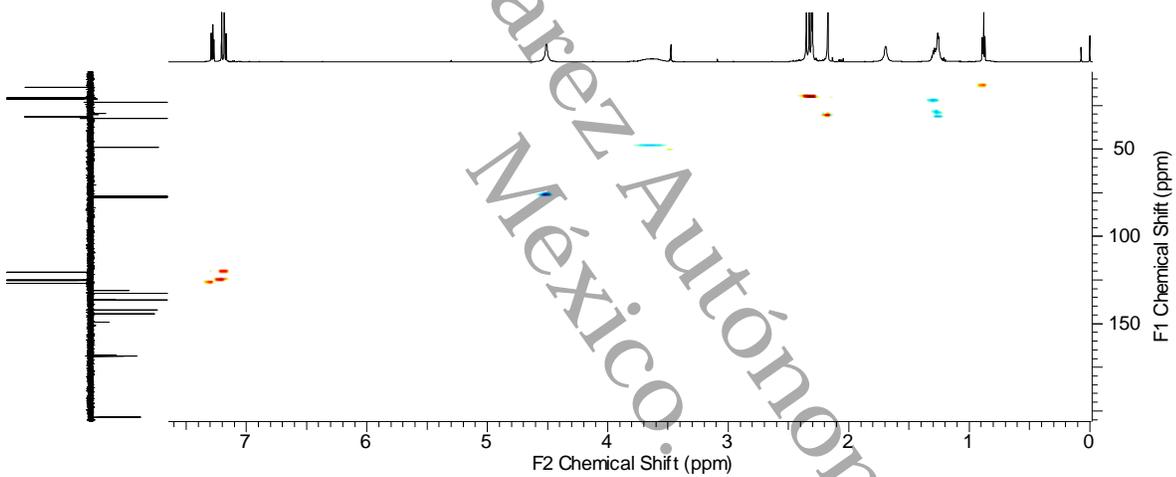


Fig. 14A HSQC (CDCl₃, 600 MHz). Compuesto (3a).

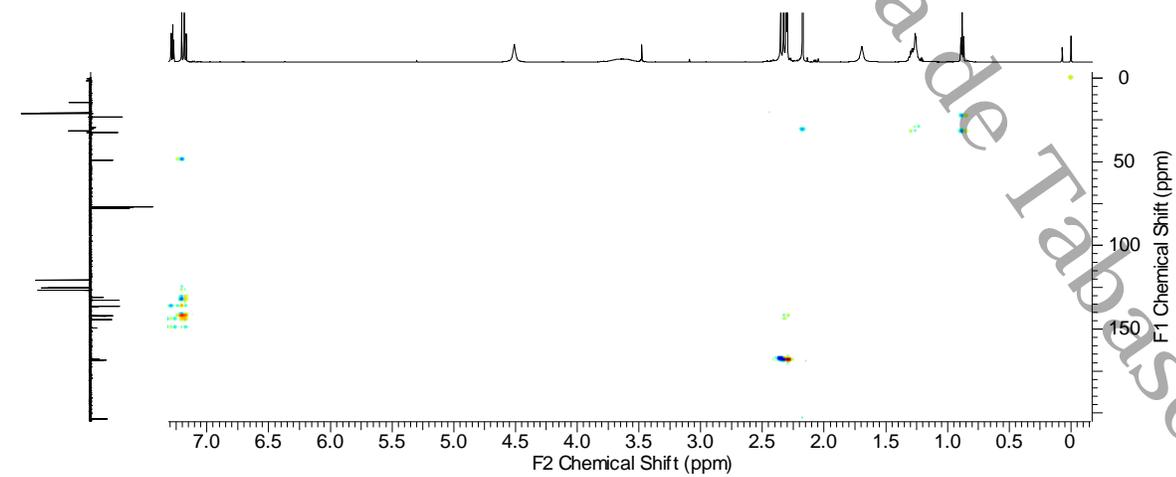


Fig. 15A HMBC (CDCl₃, 600 MHz). Compuesto (3a).

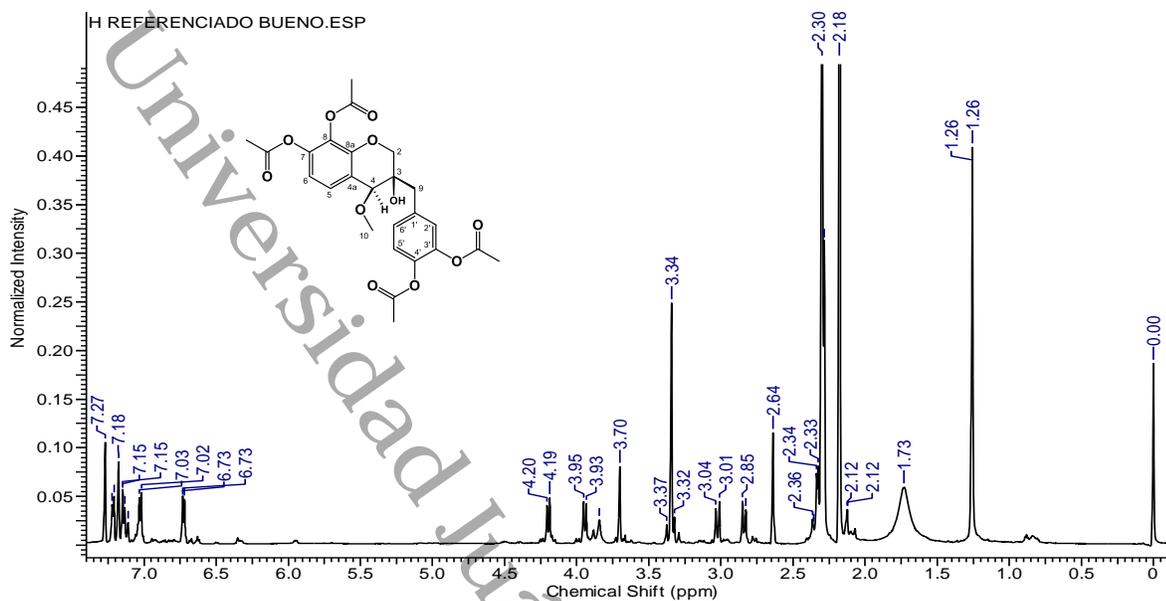


Fig. 16A RMN DE ^1H (CDCl_3 , 600 MHz). Compuesto (**4a**).

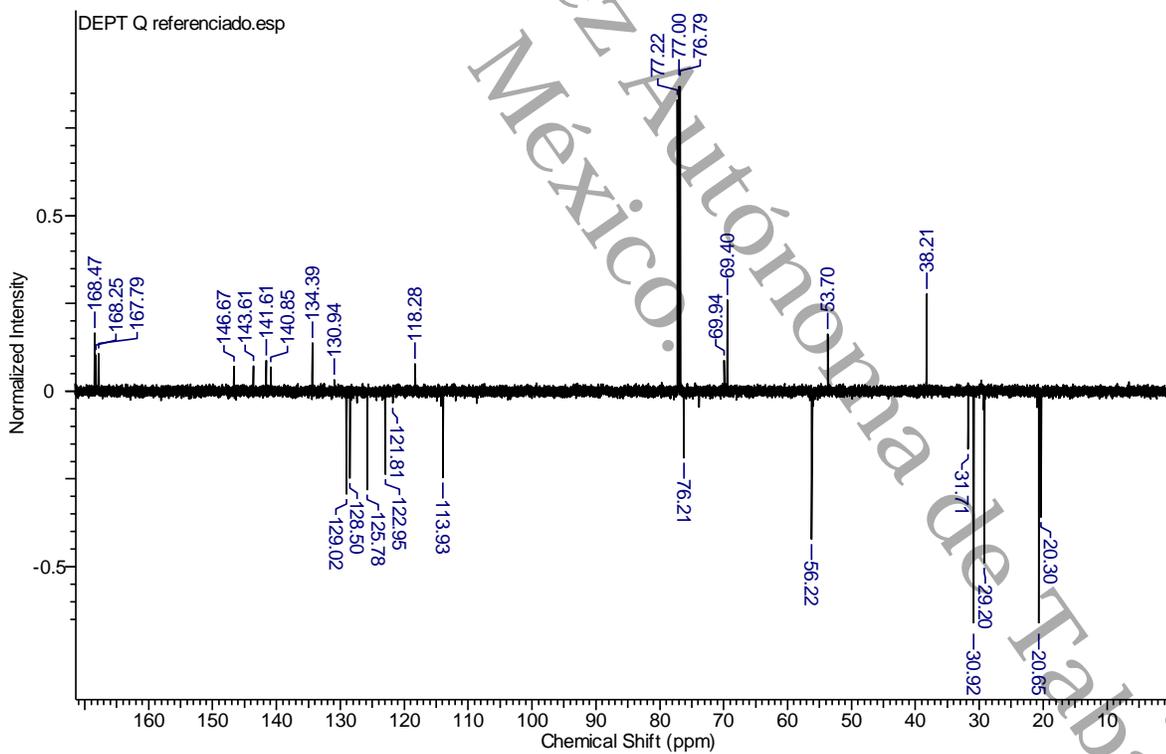


Fig. 17A DEPT (CDCl_3 , 600 MHz). Compuesto (**4a**).

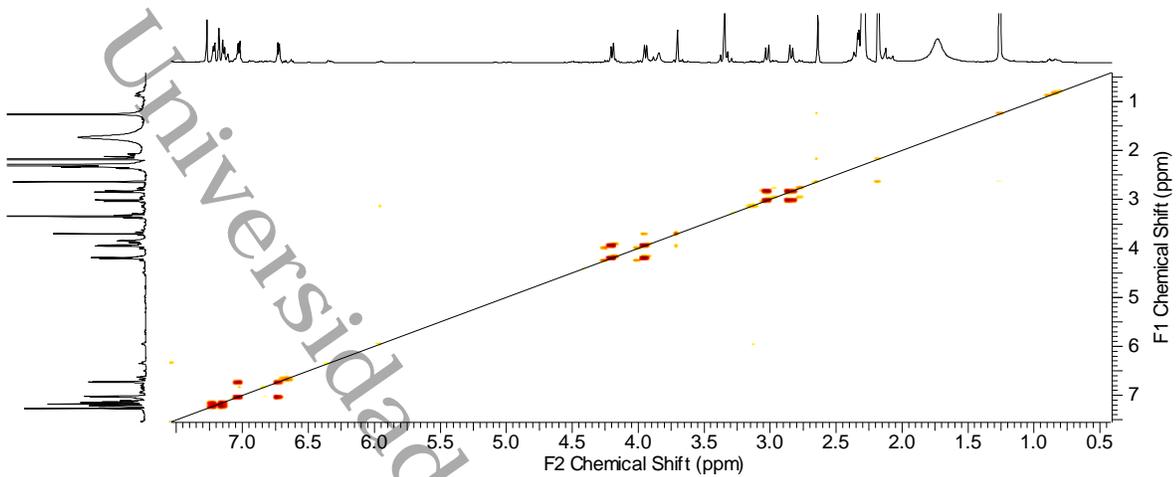


Fig. 18A COSY (CDCl₃, 600 MHz). Compuesto (4a).

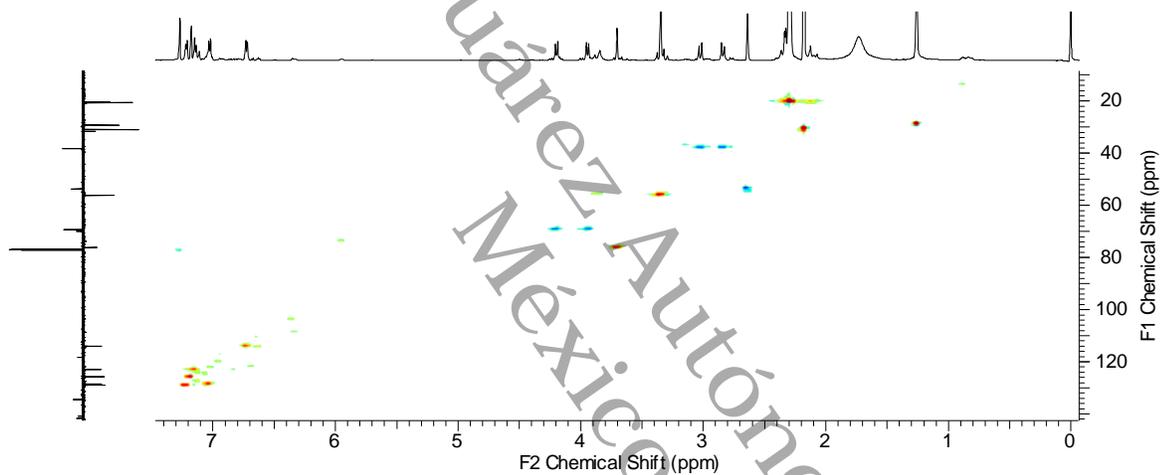


Fig. 19A HSQC (CDCl₃, 600 MHz). Compuesto (4a).

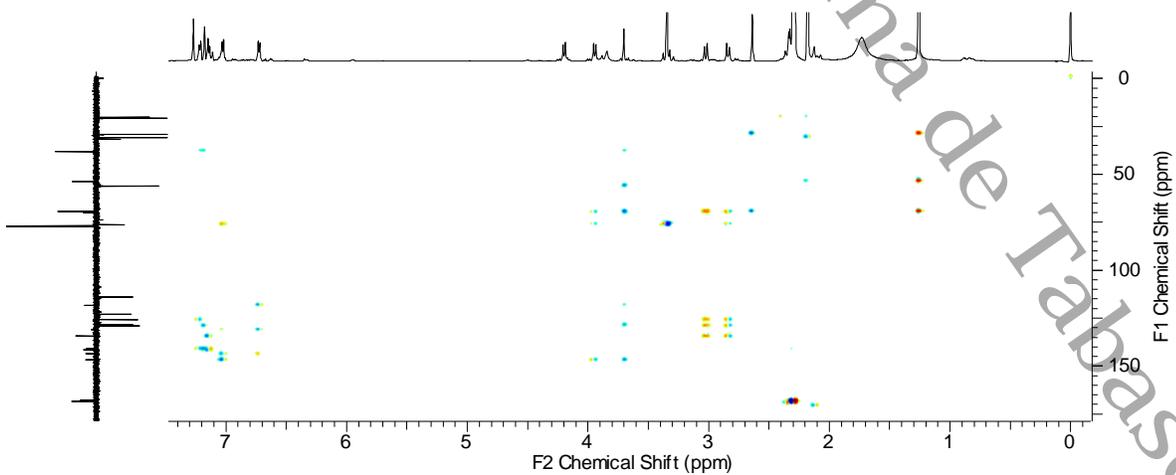


Fig. 20A HMBC (CDCl₃, 600 MHz). Compuesto (4a).

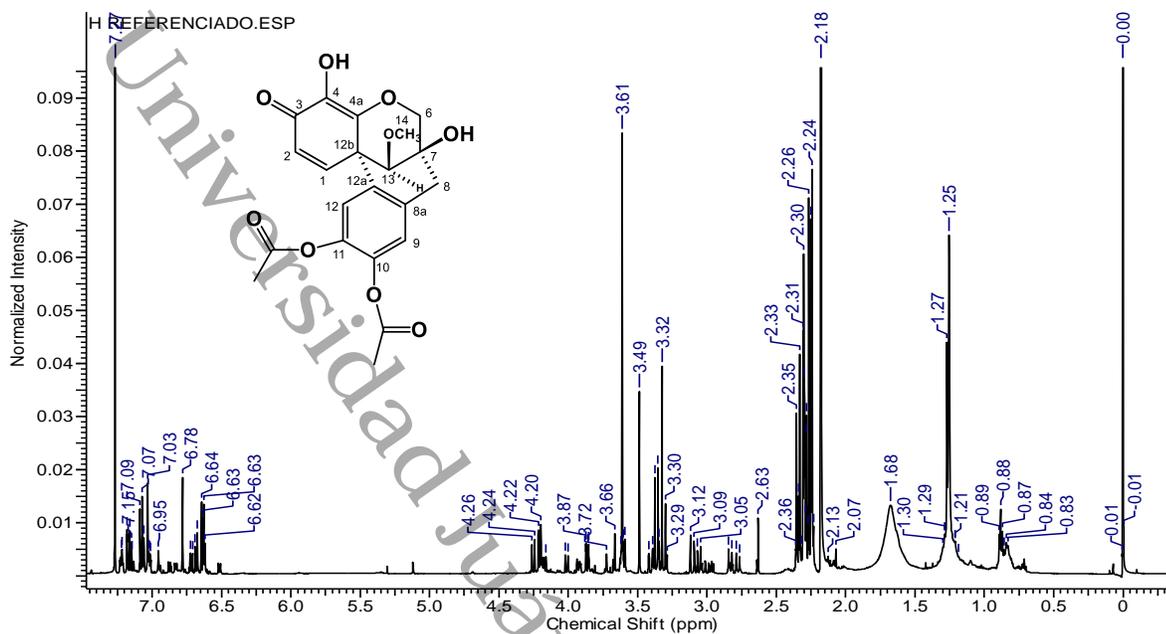


Fig. 21A RMN DE ^1H (CDCl₃, 600 MHz). Compuesto (**5a**).

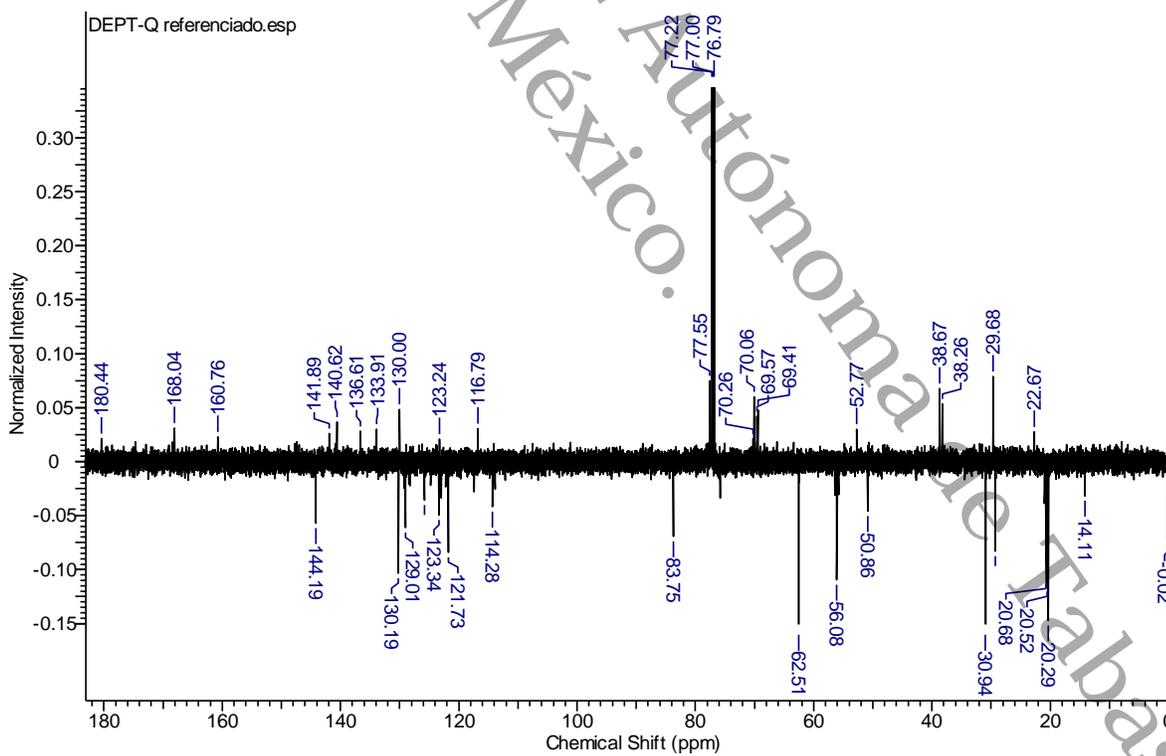


Fig. 22A DEPT (CDCl₃, 600 MHz). Compuesto (**5a**).

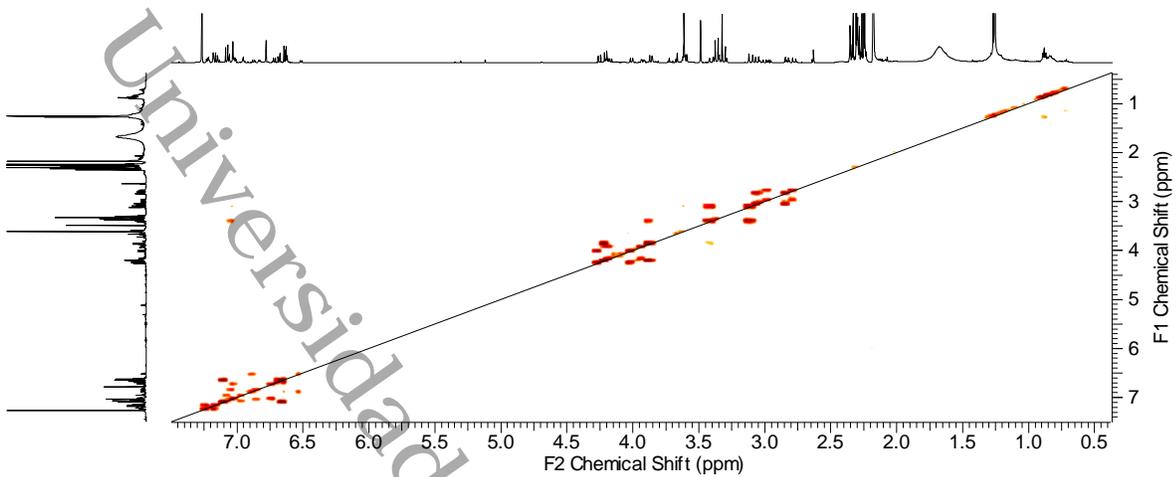


Fig. 23A COSY (CDCl₃, 600 MHz). Compuesto (**5a**).

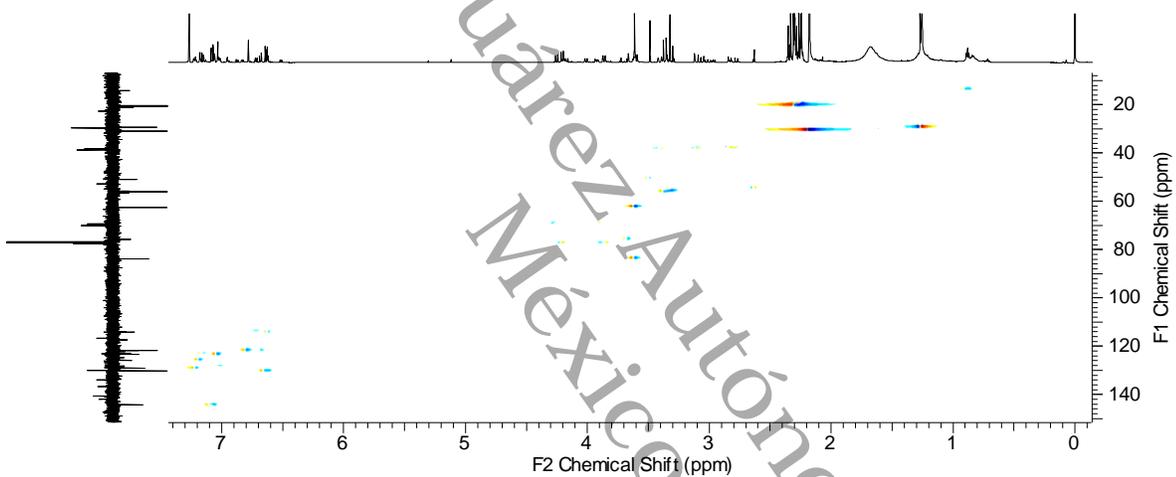


Fig. 24A HSQC (CDCl₃, 600 MHz). Compuesto (**5a**).

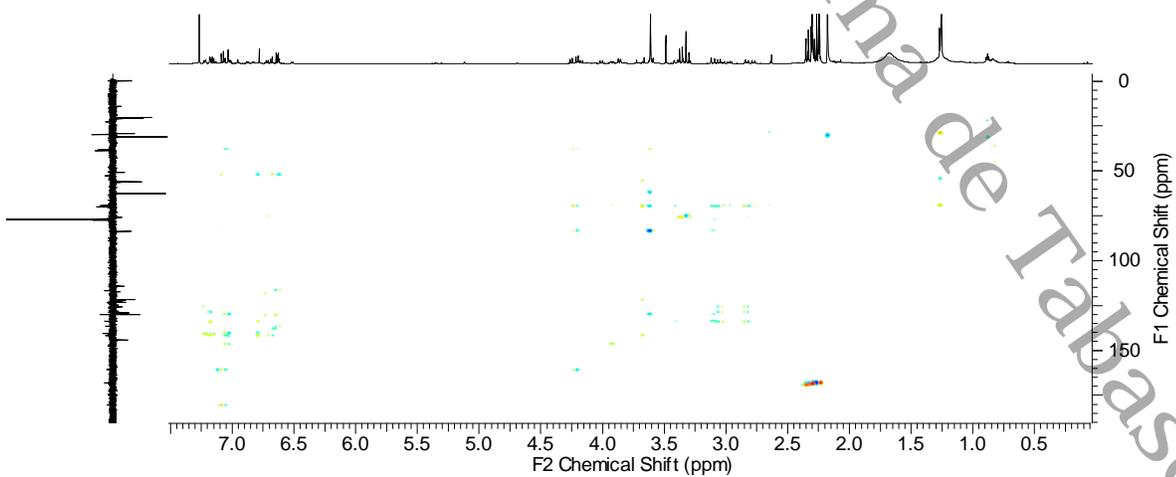


Fig. 25A HMBC (CDCl₃, 600 MHz). Compuesto (**5a**).

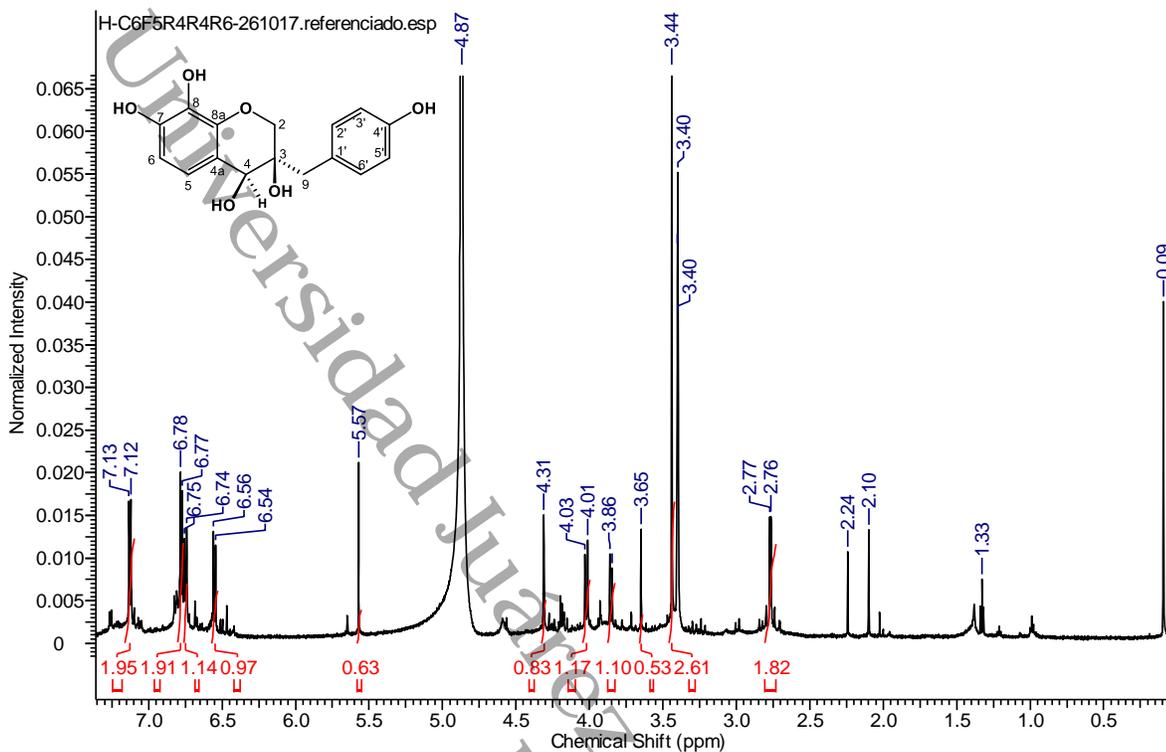


Fig. 26A RMN DE ^1H (CDCl_3 , 600 MHz). Compuesto (6).

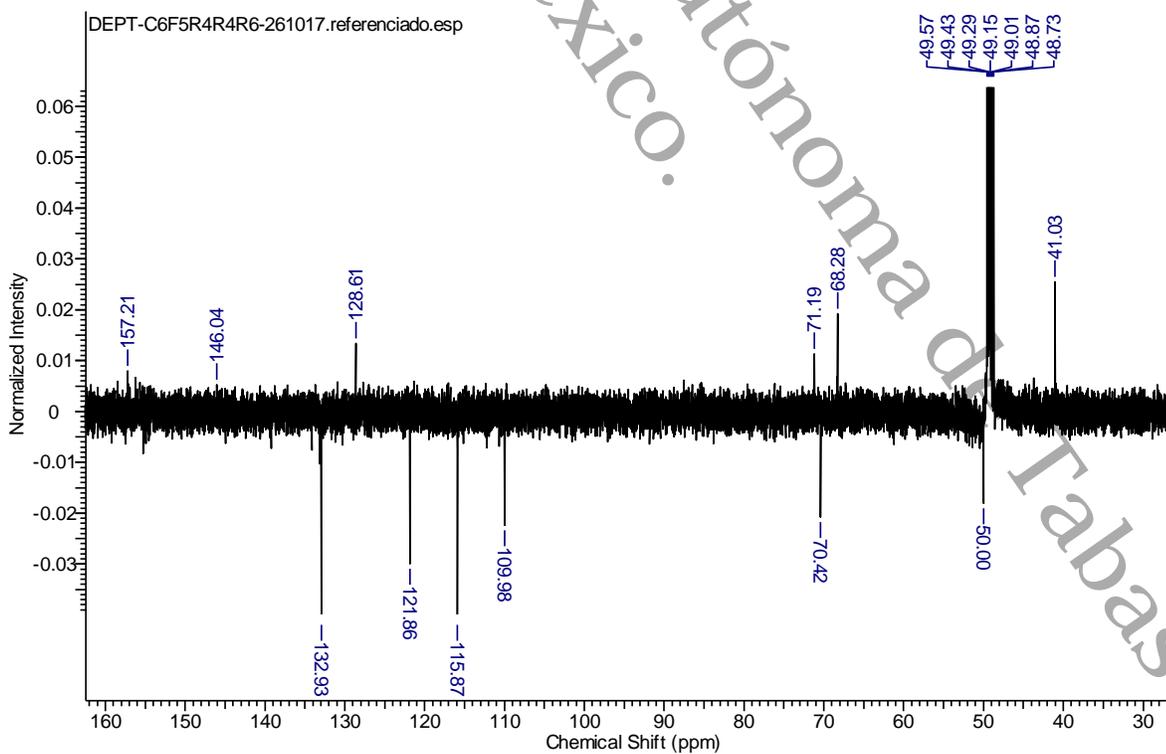


Fig. 27A DEPT (CDCl_3 , 600 MHz). Compuesto (6).

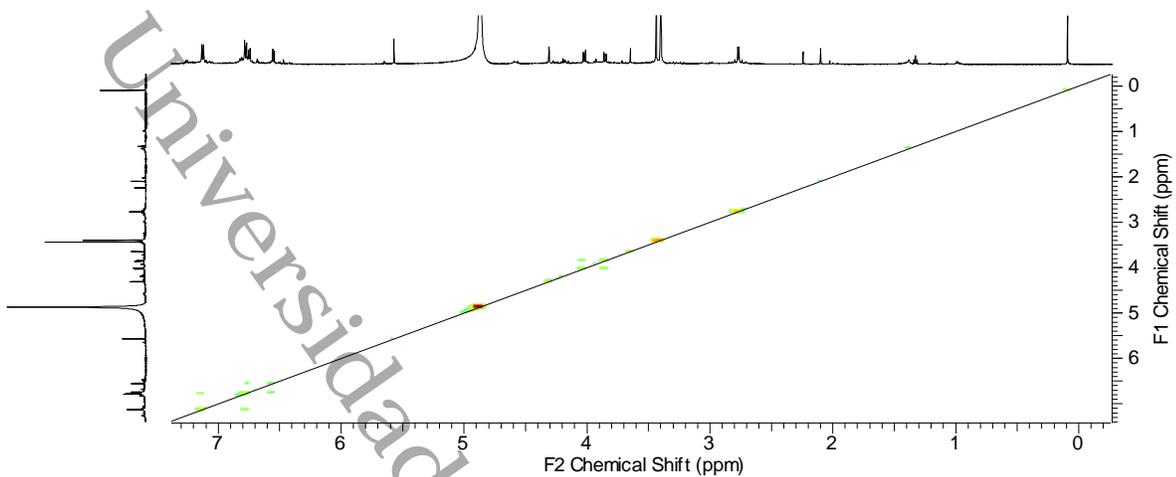


Fig. 28A COSY (CDCl₃, 600 MHz). Compuesto (6).

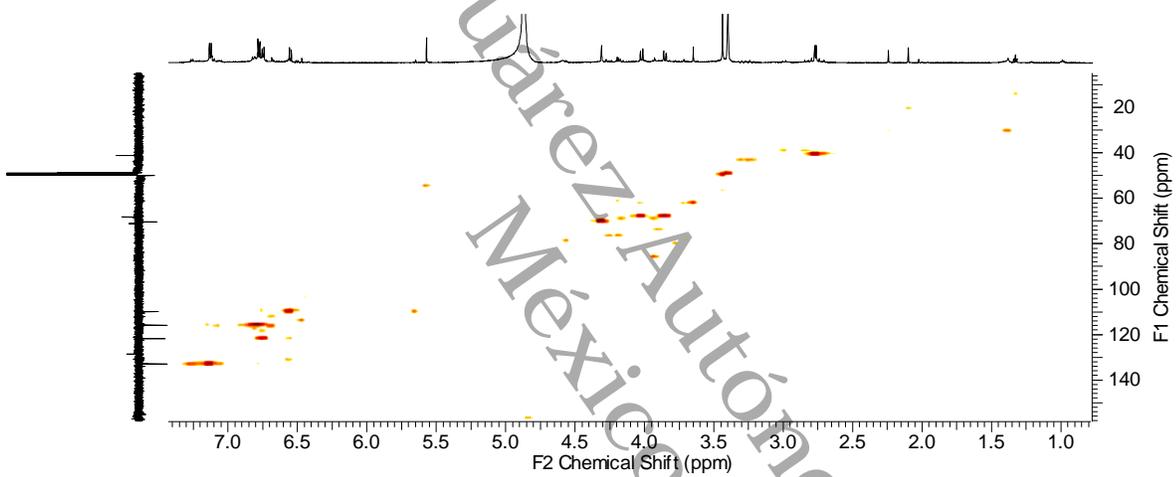


Fig. 29A HSQC (CDCl₃, 600 MHz). Compuesto (6).

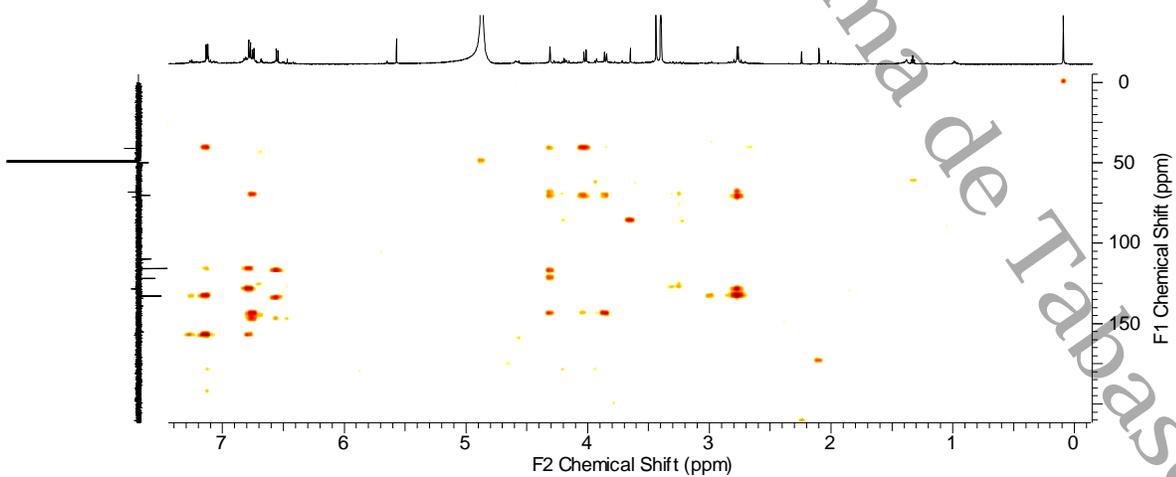


Fig. 30A HMBC (CDCl₃, 600 MHz). Compuesto (6).

Referencias bibliográficas

- Baca García, E.; Aroca, F. Factores de riesgo de la conducta suicida asociados a trastornos depresivos y ansiedad. *Salud mental*. **2014**, 37, 373-380.
- Camuñas, N.; Pérez, M. A.; Ferrándiz, P.; Tobal, M. J.; Vindel, A.; Iruarrizaga, I. Ansiedad, depresión e ira: relaciones entre el estilo atribucional y las emociones negativas. *Ansiedad y estrés*. **1999**, 5, 175-189.
- Capasso, R.; Izzo, A. A.; Pinto, L.; Bifulco, T.; Vitobello, C.; Mascolo, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*. **2000**, 71, S58-S65.
- Carey, F. A.; Giuliano, R. M. Organic chemistry. *Mc. Graw Hill Companies Inc.* New York. **2011**.
- Castillo, E.; Velázquez, M.; Rivero, Y.; Sordo, L. Arbolado para agricultura urbana y suburbana: *Haematoxylum campechianum* L. en reforestación de La Habana. *Revista Forestal Baracoa*, **2011**, 30.
- Dewhurst, D.; Larkman, P.; Cromar, S. Guinea Pig Ileum. *Learning Technology*. The University of Edinburgh. **2010**, 185-201.
- Durán, R.; Méndez, M. Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán. *CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA*. México, Apartado III. **2010**, 7, 370-372.
- Escobar-Ramos, A.; Lobato-García, C. E.; Zamilpa, A.; Gómez-Rivera, A.; Tortoriello, J.; González-Cortazar, M. Homoisoflavonoids and Chalcones Isolated from *Haematoxylum campechianum* L., with Spasmolytic Activity. *Molecules*. **2017**, 22, 1405.
- Espinosa Muñoz, M. C.; Orozco Ramírez, L. A.; Ybarra Sagarduy, J. L. (2015). Síntomas de ansiedad, depresión y factores psicosociales en hombres que solicitan atención de salud en el primer nivel. *Salud mental*. **2015**, 38, 201-208.
- Estrada-Reyes, R.; Ubaldo-Suárez, D.; Araujo-Escalona, A. G. Los Flavonoides y el sistema nervioso central. *Salud Mental*. **2012**, 35, 375-384.
- Eui-Gil, J.; Kook-Il, H.; Hyun-Jung K.; Bharat, B.; Wan-Jong, K.; Gang Min, H.; Kung-Woo, N.; Man-Deuk H. Anti-inflammatory activity of sappanchalcone isolated from *Caesalpinia sappan* L. in a collagen-induced arthritis mouse model. *Arch Pharm Res*. **2015**, 38, 973-83.
- Gagea-Iurascu, M.; Craig, S. Euthanasia and Necropsy. The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents. *Elsevier Inc.* **2012**, 117-139.
- García-Barradas, O. Introducción a la Elucidación Estructural por Resonancia Magnética Nuclear. *SARA*. México. **2016**.

Gómez-Méndez, E.; López-Noverola, U.; López-Naranjo, J.; Salaya-Domínguez, J.; Díaz-González, J.; Hernández, M. Catálogo de plantas medicinales de uso actual del Estado de Tabasco. *Fundación produce Tabasco A.C. Universidad Juárez Autónoma del Estado de Tabasco*. Villahermosa. **2004**, 55.

Gómez-Romero, J. G.; González-López, M. R.; García-Saldívar, N.; Arriaga, J. P.; Cruz-Morales, S. E. Disociación de los efectos amnésicos y ansiolíticos en el laberinto elevado en T. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*. **2006**, 32, 271-290.

Goodman, L. S.; Gilman, A. The pharmacological basis of therapeutics. Doceava Edición. *Mc. Graw-Hill*. USA. **2011**, 44-48.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. *Principales resultados del censo de población y vivienda*. **2010**.

Li-Gen, L.; Hua, X.; Hong-Lin, L.; Lin-Jiang, T.; Chun-Ping, T.; Chang-Qiang, K.; Qun-Fang, L.; Li-Ping, L.; Mei-Yu, G.; Hualiang, J.; Wei-Min, Z.; Jian, D.; Yang, Y. Naturally Occurring Homoisoflavonoids Function as Potent Protein Tyrosine Kinase Inhibitors by c-Src-Based High-Throughput Screening. *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 4419–4429.

Li-Gen, L.; Qian-Yu, L.; Yang, Y. Naturally Occurring Homoisoflavonoids and Their Pharmacological Activities. *Planta medica*. **2014**, 80, 1053–1066.

Lima, C. C.; Criddle, D. N.; Coelho-de-Souza, A. N.; Monte, F. J.; Jaffar, M.; Leal-Cardoso, J. H. Relaxant and antispasmodic actions of methyleugenol on guinea-pig isolated ileum. *Planta medica*. **2000**, 66, 408-411.

López de la Parra, M. P. M.; Mendieta Cabrera, D.; Muñoz Suarez, M. A.; Díaz Anzaldúa, A.; Cortés Sotres, J. F. Calidad de vida y discapacidad en el trastorno de ansiedad generalizada. *Salud mental*. **2014**, 37, 509-516.

Lozoya, X.; Becerril, G.; Martínez, M. Modelo de perfusión intraluminal del íleon del cobayo in vitro en el estudio de propiedades antidiarréicas de la guayaba (*Psidium guajava*). *Arch. invest. Méd.* **1990**, 21, 155-62.

Maldonado M. F. Flora Medicinal del Estado de Tabasco: uso, manejo y conservación. *UJAT*. Villahermosa, Tabasco México. **2005**, 97.

Martínez, M. Las Plantas Medicinales de México Tomo 1. Séptima Edición. *Editorial Botas*. México. **2005**, 386, 234-235.

Masahiro, N.; Seiji, N.; Shu-Mei, L.; Ikuyo, E.; Ken-Ichi, K. Protosappanin A, a Novel Biphenyl Compound from *Sappan Lignum*. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, 34, 1-6.

- Masuda, H.; Ohtani, K.; Mizutani, K.; Ogawa, S.; Kasai, R.; Tanaka, O. Chemical Study on *Haematoxylum campechianum*: a sweet Principle and New Dibenz[b, d]oxocin Derivates. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, 39, 1382-1384.
- Mata, R.; Rivero-Cruz, J. F.; Rojas, A. Bioactive natural products of medicinal and agrochemical interest from selected Mexican medicinal plants. Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of Medicinal Plants from the Americas. *Singapore, Harwood Academic Publishers.* **1999**, 161-183.
- Mata, R., Rojas, A., Acevedo, L., Estrada, S., Calzada, F., Rojas, I., Linares, E. Smooth muscle relaxing flavonoids and terpenoids from *Conyza filaginoides*. *Planta medica.* **1997**, 63, 31-35.
- Mazzuco, G.; Basolo, B.; Monga, G. The Use of Mallory's Phosphotungstic Acid-Hematoxilin (PTAH) Stain in Renal Pathology. *Path. Res. Pract.* **1982**, 175, 380-391.
- Medina, M. E.; Borges, G.; Lara, C.; Benjet, C.; Blanco, J.; Fleiz, C.; Villatoro, J.; Rojas, E.; Zambrano, J.; Casanova, L.; Gaxiola, S. A. Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: resultados de la encuesta nacional de epidemiología psiquiátrica en México. *Salud mental.* **2003**, 26, 1-16.
- Menazza, S.; Wong, R.; Nguyen, T.; Wang, G.; Gucek, M.; Murphy, E. 2013. CypD^{-/-} hearts have altered levels of proteins involved in Krebs cycle, branch chain amino acid degradation and pyruvate metabolism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* **2013**, 56, 81-90.
- Ming-Bo, Z.; Jun, L.; She-Po, S.; Chen-Qiu, C.; Peng-Fei, T.; Li, T.; Ke-Wu, Z.; Yong, J. Two New Phenolic Compounds from the Heartwood of *Caesalpinia sappan* L. *Molecules.* **2014**, 19, 1-8.
- Moreno, L.; Lamprea, M.; Duenas, Z.; Diferencias en los comportamientos asociados con la ansiedad de ratas macho y hembra expuestas a un protocolo de estrés crónico por separación maternal temprana. *Suma Psicológica.* **2009**, 16, 1, 31-43.
- Nakanishi, K. One-dimensional and Two-dimensional NMR Spectra by Modern Pulse Techniques. *University Science Books, USA.* **1990**.
- Namikoshi, M.; Nakata, H.; Nuno, M.; Ozawa, T.; Saitoh, T. Homoisoflavonoid and Related Compounds. III. Phenolic Constituents of *Caesalpinia Japonica* SIEB. et ZUCC. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35, 3568-3575.
- Norton, S. The useful plants of dermatology. II. *Haematoxylum* and hematoxylin. *J. of the American Academy of Dermatology*, Honolulu Hawaii. **1996**, 34, 149-151.
- OMS. Día Mundial de la salud mental. **2017**.
- OMS. Más sano, más justo, más seguro. La travesía de la salud mundial 2007-2017. **2017**.
- Parra D. H.; Delgado G.; Romo de Vivar A. Temas selectos de química de productos naturales. *UNAM. México, D. F.* **2015**, 190.

- Perkin, W.; Robinson, R. Brazilin and Haematoxylin. Part VII. Synthesis of derivatives of hydrindene closely allied to brazilin and haematoxylin. *J. of the Chemical society, transactions*. **1907**, 91, 1073-1103.
- Polanco, L. A.; Vargas-Irwin, C.; Góngora, M. E. Modelos animales: Una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. *Suma Psicológica*. **2011**, 18, 141-148.
- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henderson, G. Farmacología. Séptima Edición. *Elsevier Inc.* Barcelona, España. **2012**, 8-15.
- Sarna, S. K. In vivo signal-transduction pathways to stimulate phasic contractions in normal and inflamed ileum. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. **1998**, 274.
- Serrano Gallardo, L. B. Actividad antiespasmódica de extractos de plantas medicinales en preparaciones de íleon de cobayo (Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León). **2005**, 3-9.
- Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. Fundamentos de Química Analítica. Novena Edición. *CENGAGE Learning*. México D. F. **2015**.
- Thomas, E. A.; Bertrand, P. P.; Bornstein, J. C. Genesis and role of coordinated firing in a feedforward network: a model study of the enteric nervous system. *Neuroscience*. **1999**, 93, 1525-1537.
- Tortoriello, J.; Meckes-Fischer, M.; Villarreal, M. L.; Berlin, B.; Berlin, E. Spasmolytic activity of medicinal plants used to treat gastrointestinal and respiratory diseases in the Highland of Chiapas. *Phytomedicine*. **1995**, 2, 57-66.
- University of Edinburgh, Department of Pharmacology. Pharmacological experiments on isolated preparations. *Churchill Livingstone*. **1970**, 2, 44, 58-62 y 71.
- Wade, L. G., Jr. Organic Chemistry. Eighth edition. *Pearson*. USA. **2013**.
- Waldeyer, W. Untersuchungen über den Ursprung und den Verlauf des Axencylinders bei Wirbellosen und Wirbelthieren sowie über dessen Endverhalten in der quergestreiften Muskelfaser. *Henle Pfeifer's Z. Rat. Med*. **1863**, 20, 193-256.
- Weimann C.; Goransson U. Spasmolytic effects of baccharis cunferta and some of its constituents. *J. Pharm Pharmacol*. **2002**, 54, 99-104.
- Weininger, S., J.; Stermitz, F., R. Química Orgánica. *Reverté, S. A.* Barcelona España. **1988**.
- Yasunaka, K.; Abe, F.; Nagayama, A.; Okabe, H.; Lozada-Pérez L.; López-Villafranco, E.; Estrada-Muñiz, E.; Aguilar, A.; Reyes Chilpa, R. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *J. of Ethnopharmacology*. **2005**, 97, 293-299.
- Zhang, Z. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sci*. **2004**, 75, 1659-1699.