

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ENSAYOS DE ACTIVIDAD
ANTIINFLAMATORIA DE EXTRACTOS Y
FRACCIONES DE DIFERENTES
POLARIDADES DE *Alnus acuminata* sbsp. *arguta*
(SCHLECHT) FURLOW.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JUAN CARLOS GÓMEZ VERJÁN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EL PRESENTE PROYECTO SE REALIZO EN EL LABORATORIO 125 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA EN EL CONJUNTO "E" DE LA FACULTAD DE QUIMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Prof. MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS

VOCAL: Prof. ANDRES NAVARRETE CASTRO

SECRETARIO: Prof. JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ

1er SUPLENTE: Prof. ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ

2do SUPLENTE: Prof. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDIVAR

Sitio donde se desarrollo el tema :

Laboratorio 125 del Departamento de Farmacia, Conjunto "E".
Facultad de Química, UNAM

A S E S O R:

DRA. MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS

S U S T E N T A N T E:

JUAN CARLOS GOMEZ VERJAN

AGRADECIMIENTOS

A LA UNAM POR LA FORMACIÓN ACADÉMICA RECIBIDA, Y POR SER LA MEJOR UNIVERSIDAD DEL MUNDO.

A LA FACULTAD DE QUÍMICA, POR OTORGARME CONOCIMIENTOS, EXPERIENCIAS, AMISTADES Y PERSPECTIVAS, QUE PERMITEN FORJAR UNA BASE SÓLIDA PARA LA SUPERACIÓN TANTO ACADÉMICA COMO PERSONAL.

A LA D.G.A.P.A. (DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO DE LA UNAM) POR EL APOYO ECONÓMICO OTORGADO MEDIANTE UNA BECA A TRAVÉS DEL PROYECTO IN 211807.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO DESIGNADO POR LA REVISIÓN DEL MANUSCRITO DE TESIS, POR SUS VALIOSOS COMENTARIOS Y OBSERVACIONES.

AL DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO POR LA REVISIÓN DEL MANUSCRITO DE TESIS Y POR SUS VALIOSAS APORTACIONES Y COMENTARIOS.

AL M. EN C. JUAN FRANCISCO PALACIOS POR SU VALIOSA AYUDA EN EL PROCESAMIENTO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES Y APOYO DURANTE LA REALIZACIÓN DE LA TESIS.

POR ÚLTIMO A LA DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS, POR SU ENSEÑANZA, POR SU GUÍA, POR SU PACIENCIA Y TIEMPO DEDICADO, PERO SOBRE TODO POR SU AMISTAD.

DEDICATORIAS Y PENSAMIENTOS

A mis padres; por su apoyo incondicional en todo momento.

- La ciencia es la estética de la inteligencia -

Gastón Bachelard (1884-1962) *Filósofo francés.*

- Hay dos maneras de difundir la luz... ser la lámpara que la emite, o el espejo que la refleja -

Confucio (551 AC-478 AC) *Filósofo chino*

CONTENIDO

Índice de tablas	I
Índice de esquemas y figuras	II
Índice de graficas	III
1.-Introducción.....	1
2.-Fundamentos teóricos.....	3
2.1.-Familia <i>Betulaceae</i>	3
2.1.1.-Género <i>Alnus</i>	4
2.2.-Generalidades de <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i> (Schlecht.) Furlow.....	5
2.2.1.-Nomenclaturas de <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i>	7
2.2.2.-Nombres comunes de <i>Alnus acuminata</i>	7
2.2.3.-Distribución y ecología de <i>Alnus acuminata</i>	8
2.3.-Composición química del género <i>Alnus</i>	9
2.4 .-Usos de <i>Alnus acuminata</i>	12
2.5.-Actividad biológica del género <i>Alnus</i>	13
2.5.1.-Actividad biológica de la especie <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i> (Schlecht.) Furlow	15
2.6.-Inflamación.....	16
2.6.1.-Generalidades sobre el proceso inflamatorio.....	16
2.6.2.-Mediadores de la inflamación.....	17
2.6.3.-Inflamación aguda.....	21

2.6.4.-Inflamación crónica.....	21
2.7.-Agentes antiinflamatorios.....	22
2.7.1.-Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (FAINES).....	22
2.8.-Modelo de inflamación inducido por carragenina.....	23
2.9.-Productos naturales como agentes antiinflamatorios.....	24
3.-Objetivos, Hipótesis y Justificación.....	27
4.-Materiales y Métodos.....	29
4.1.-Material vegetal.....	29
4.2.-Preparación de extractos vegetales.....	29
4.3.-Evaluación antiinflamatoria utilizando el modelo de inflamación inducida por carragenina	30
4.4.-Desarrollo del experimento biodirigido. fraccionamiento de extractos	33
4.5.-Análisis estadístico.....	33
5.-Resultados y discusión.....	36
5.1.-Pruebas de actividad antiinflamatoria	37
6.-Conclusiones	56
7.-Perspectiva.....	57
8.-Bibliografía.....	58
-Anexo A (Estructuras Químicas FAINE´S)	63
-Anexo B (Estructuras Químicas de productos naturales con actividad sobre el sistema inmunológico)	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Especies del género <i>Alnus</i>	5
Tabla 2 Clasificación científica de <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i>	5
Tabla 3 Metabolitos más importantes encontrados en la especie <i>Alnus</i>	12
Tabla 4 Extractos obtenidos.....	36
Tabla 5 Actividad antiinflamatoria de extractos primarios de corteza	44
Tabla 6 Actividad antiinflamatoria de las fracciones primarias obtenidas a partir del extracto metanólico.....	48
Tabla 7 Actividad antiinflamatoria de las diferentes dosis trabajadas para las fracciones primarias metabólicas	51
Tabla 8 Actividad antiinflamatoria de las diferentes fracciones secundarias probadas.....	53

INDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS

Figura 1 Imagen de <i>Alnus glutinosa</i> especie muy representativa de la familia <i>Betulaceae</i>	3
Figura 2 <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i>	6
Figura 3 Distribución de <i>A. acuminata</i> en México y Centroamérica.....	8
Figura 4 Metabolismo del ácido araquidónico.....	19
Figura 5 Pletismómetro. Plethysmometer UGO Basile (Mod. 7140).....	32

ESQUEMAS

Esquema 1. Reacciones de alteración de membrana	20
Esquema 2. Proceso de obtención de los extractos de la corteza de <i>A. acuminata</i>	29
Esquema 3. Esquema general de la metodología utilizada para determinar la actividad antiinflamatoria en extractos de la corteza de <i>A. acuminata</i> ssp <i>arguta</i>	34
Esquema 4. Esquema general de la metodología utilizada para determinar la actividad antiinflamatoria en fracciones de la corteza de <i>A. acuminata</i> ssp. <i>arguta</i>	35

INDICE DE GRAFICAS

Gráfico 1: Curva curso-temporal del efecto antiinflamatorio (ΔV) del extracto hexánico -----	38
Gráfico 1-A: Relación de Áreas Bajo la Curva (ABC en mL x min.) para las diferentes dosis del extracto hexánico -----	38
Gráfico 2: Curva curso-temporal del efecto antiinflamatorio (ΔV) del extracto clorofórmico -----	39
Gráfico 2-A: Relación de Áreas Bajo la Curva (ABC en mL x min.) para las diferentes dosis del extracto clorofórmico - -----	39
Gráfico 3: Curva curso-temporal del efecto antiinflamatorio (ΔV) de extracto metanólico -----	40
Gráfico 3-A: Relación de Áreas Bajo la Curva (ABC en mL x min.) del grafico anterior para las diferentes dosis del extracto metanólico -----	40
Gráfico 3-B: Curva curso-temporal del efecto antiinflamatorio (ΔV) de extracto metanólico -----	42
Grafico 3-C: Relación de Área Bajo la Curva (ABC en mL x min.) para las diferentes dosis del extracto metanólico-----	43
Grafica 4: Porciento de inhibición de los extractos metanólicos, clorofórmico, hexánico e indometacina -----	44
Grafico 5: Curva curso-temporal del efecto antiinflamatorio de las fracciones primarias del extracto metanólico -----	46

Grafico 5-A: Relación de áreas bajo la curva (ABC) de las fracciones primarias del extracto metanólico -----	47
Grafico 6: Porcentaje de inhibición del edema inducido con carragenina de las fracciones primarias -----	47
Grafico 7: Curva curso-temporal del efecto antiinflamatorio de las diferentes dosis probadas de la fracción metanólica -----	49
Grafica 7-A: Relación de áreas bajo la curva (ABC) de las diferentes dosis probadas de la fracción metanólica -----	50
Grafica 8: Porcentaje de inhibición del edema inducido con carragenina de las diferentes dosis probadas de la fracción metanólica primaria -----	50
Grafica 9: Curva curso-temporal del efecto antiinflamatorio de las fracciones secundarias del extracto metanólico -----	52
Grafica 10-A: Relación de áreas bajo la curva (ABC) de las fracciones secundarias del extracto metanólico -----	49
Grafica 11: Porcentaje de inhibición del edema inducido con carragenina a la 1, 3 y 5 horas de las diferentes subfracciones probadas -----	50



1.-INTRODUCCION

Las plantas constituyen un recurso muy valioso dentro de la medicina tradicional de los diferentes países. El nuestro no es la excepción ya que la medicina popular herbolaria goza de una gran tradición debido principalmente a la gran abundancia y biodiversidad de especies vegetales.

El estudio general (químico, etnobotánico, farmacológico y bioquímico) de la flora del país resulta interesante ya que los compuestos que provienen de fuentes naturales juegan un papel muy importante en la medicina moderna; muchos de ellos son fármacos clínicamente útiles para el tratamiento de enfermedades, otros proveen compuestos básicos que pueden ser modificados químicamente para la elaboración de principios activos, otros más, utilizados como modelos o prototipos para producir fármacos sintéticos y también existen los que sin tener una aplicación directa en terapéutica, constituyen herramientas valiosas en investigación. Cabe destacar además, que en la industria farmacéutica existe una fuerte competencia por la enorme cantidad de patentes de fármacos y medicamentos que existen actualmente, y por otra parte, puede llegar a resultar el desarrollo de nuevos fármacos, por lo que la investigación de productos naturales innovadores que no estén patentados y que posean una mayor eficacia terapéutica, por una parte o de estructuras activas de fácil síntesis, ayudaría a resolver problemas de salud y al desarrollo de la industria farmacéutica del país.

Dentro de las patologías que actualmente más aquejan a la humanidad se encuentran las relacionadas con el sistema inmunológico lo cual puede dar pie a serios desórdenes de salud cuando se encuentra debilitado o sobre activado, además, en recientes investigaciones se ha encontrado que este sistema está estrechamente involucrado con el desarrollo de enfermedades crónicas severas, tales como diabetes, daños degenerativos, aterosclerosis, e inclusive cáncer. Cuando el sistema inmunológico está sobre activado puede provocar inflamación crónica la cual puede llevar a una destrucción no específica de cualquier tipo de tejido, dañando por lo tanto cualquier tipo de órgano, aparato o sistema.



La medicina alopática ha provisto de un número de fármacos que resultan limitados tanto para el tratamiento como para la prevención de este tipo de padecimientos (debido a la complejidad que revisten), sin embargo, los productos herbolarios utilizados en medicina tradicional han generado un renovado interés debido a que ofrecen una alternativa en este campo.

Dentro de la medicina tradicional del país se han encontrado especies vegetales muy utilizadas para padecimientos que cursan con inflamación; una de estas plantas es el *Aile*: *Alnus acuminata* ssp. *arguta* utilizada ampliamente para tratamiento de enfermedades relacionadas con daño inflamatorio. Lo anterior motivó el estudio de esta especie con la finalidad de aislar el o los metabolitos secundarios responsables de la actividad antiinflamatoria (si es que ésta se comprueba) y de esta manera contribuir al estudio de la flora mexicana y en especial de este género del cual muy poca es la información que se tiene no sólo en el país, sino de otras especies latinoamericanas del mismo género.



2.-FUNDAMENTOS TEORICOS

2.1. Familia Betulaceae:

La familia Betulaceae es una familia de alrededor de 70 a 157 especies diferentes de árboles o arbustos dicotiledóneos caducifolios y monoicos, repartida en 6 géneros, la mayor parte naturales de las regiones templadas y zonas de montaña en los países templados del hemisferio norte. Poseen hojas simples, alternas, con estípulas caducas. Tienen flores masculinas con perianto simple, en grupos de 3 en la axila de una bráctea, dispuestas en amentos colgantes. Flores femeninas sin perianto, de gineceo ínfero bicarpelar, en grupos de 2 ó 3 en la axila de una bráctea, dispuestas en amentos derechos. Frutos secos que no se abren durante la madurez, a menudo alada, las semillas contienen aceites, las hojas y sobre todo la corteza, taninos y rara vez glucósidos (Figura 1).



Figura 1 . Imagen de *Alnus glutinosa* especie muy representativa de la familia *Betulaceae*.

En el pasado, esta familia estaba dividida en dos, Betulaceae (*Alnus* y *Betula*) y Corylaceae (resto de especies); sin embargo, estudios recientes por el “Grupo de filogenistas de Angiospermas” (*Angiosperms Phylogeny Group*), han llevado a incluir la antigua familia Corylaceae dentro de la Betulaceae (Tabla 2). Los géneros principales dentro de esta familia son: *Carpinus*, *Corylus*, *Betula* (37 especies) y *Alnus* (Fontquer, 1962).



2.1.1 Genero *Alnus*

Alnus es un género de la familia de las *Betuláceas* (Tabla 2). Contiene mas de 30 especies de árboles y arbustos monoicos (de los cuales muy pocos llegan a alcanzar gran tamaño), denominados **alisos**, distribuidos por todo el mundo. Presentan hojas ovadas y de borde dentado o serrado. Las flores están en forma de amentos, los masculinos alargados y los femeninos cortos, ambos en la misma planta (<http://es.wikipedia.org/wiki/Alnus>). El fruto es una nuez monosperma, alada y con dispersión libre, ovoide, comprimido y sostenido por una bractea aliforme persistente (*Ostrya*). Este género está constituido por algunas de las siguientes especies :

Especies del género <i>Alnus</i>		
<i>A. acuminata-</i> "Aile"	<i>A. glutinosa</i> "aliso"	<i>A. viridis</i>
<i>A. alnobetula</i>	<i>A. inokumai</i>	<i>A. japonica</i> "Hannoki"
<i>A. densiflora</i>	<i>A. julianiformis</i>	<i>A. koreana</i>
<i>A. cremastogyne</i>	<i>A. kamtschatica</i>	<i>A. matsumurae</i> "Yahazu-han-no-ki"
<i>A. cordata</i>	<i>A. kefersteinii</i>	<i>A. maximowiczii</i> "Miyamahan-no-ki"
<i>A. fauriei</i> "Miyama-kawara-hannoki",	<i>A. mandshurica</i>	<i>A. pendula</i> "Himeyashabushi"
<i>A. ferdinandi</i>	<i>A. mollis</i>	<i>A. trabeculosa</i> "Sakuraba-hannoki"
<i>A. firma</i> "Yashabushi"	<i>A. oregana</i>	<i>A. serrulatoides</i> "Kawarahan-no-ki"
<i>A. firmifolia</i>	<i>A. nitida</i>	<i>A. mayrii</i> "Usuge-hiroha-hannoki"



<i>A. formosana</i>	<i>A. pringlei</i>	<i>A. menzelii</i> "Raniecka-Bobrowska"
<i>A. fruticosa</i> ,	<i>A. rhombifolia</i>	<i>A. multinervis</i>
<i>A. glabrata</i>	<i>A. sinuata</i>	<i>A. noveboracensis</i>
<i>A. henryi</i>	<i>A. nepalensis</i>	<i>A. sieboldiana</i> "Ôbayashabushi"
<i>A. incana</i>	<i>A. serrulata</i>	<i>A. tinctoria</i>
<i>A. hirsuta</i> "Keyama-hannoki"	<i>A. tenuifolia</i>	<i>A. subcordata</i>

Tabla 1. Especies del género *Alnus* (Angiosperms Phylogeny Group)

2.2 .- Generalidades de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (Schlecht) Furlow

Aliso o Aile, *Alnus acuminata* ssp *arguta*, pertenece a la Familia Betulaceae (Tabla 4); cabe destacar que *Alnus acuminata* en Latinoamérica se encuentra principalmente dividida en tres subespecies: *arguta*, *acuminata* y *glabrata*, las cuales restringen su distribución a América del Sur (<http://es.wikipedia.org/wiki/Alnus>).



Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fagales
Familia	Betulaceae
Género	<i>Alnus</i>
Especie	<i>A. acuminata</i>
Subespecie	<i>A. acuminata</i> sbsp. <i>arguta</i>

Tabla 2. Clasificación científica de *Alnus acuminata* ssp *arguta*

Son árboles de 5 y hasta 10 m de alto, aunque pueden alcanzar una altura de hasta 30 metros, con un diámetro de hasta 1m; poseen un tronco único desde la base, a veces varios, corteza escamosa, gris, con lenticelas observables a simple vista, el follaje es perenne cuando crece en quebradas húmedas y caducifolias en laderas semisecas.

-*Hojas*: alternas, con láminas ovoideas, algo resinosas, con el ápice acuminado y el borde dentado.

-*Flores*: son unisexuales, masculinas y femeninas sobre un mismo árbol, pero en inflorescencias diferentes, flores masculinas largas y delgadas agrupadas en amentos, y las flores femeninas con brácteas formando un cono estrobiliforme y en racimos.

-*Frutos*: asemejan a nueces pequeñas, aladas, protegidas dentro del estróbilo leñoso, liberadas en la madurez y que son diseminadas por el viento y el agua (http://www.arboles.org/paginas/alnus_acuminata.html)



- **Figura 2.** *Alnus acuminata* ssp. *arguta*

Se ha encontrado una diferenciación genética dentro de las distintas poblaciones de la especie *A. acuminata*, de hasta 11% entre sus diferentes poblaciones y un 5% de diferenciación genética entre poblaciones dentro de una misma región geográfica. Esto fue encontrado al estudiarse distintos loci de determinadas isoenzimas (Murillo, 2000). Cabe destacar que se han realizado pocos estudios en este campo, por lo que es probable que la variación genética entre las poblaciones sea mayor a la antes mencionada; además de que únicamente se han hecho estudios con poblaciones de Costa Rica y Panamá. La alta variación se atribuye a un bajo flujo genético entre poblaciones, debido a que se encuentran aisladas geográficamente.

2.2.1 Nomenclaturas de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*

La clasificación de las especies de *Alnus* mexicanas es un tanto confusa. Rzedowski describe al género *Alnus* con 6 especies (*A. acuminata*, *A. arguta*, *A. glabrata*, *A. jorullensis*, *A. firmifolia* y *A. lutea*). Furlow da otra clasificación: *A. acuminata* ssp. *arguta*, *A. acuminata* ssp. *glabrata*, *A. jorullensis* ssp. *jorullensis* y *A. jorullensis* ssp. *lutea*. El mismo Furlow sugiere la necesidad de profundizar más en la investigación taxonómica del



género, actualmente se utiliza la nomenclatura propuesta por el mismo. Cabe destacar que a lo largo del tiempo se le han asignado los siguientes sinónimos a esta subespecie:

Alnus acuminata Kunth, 1817; *Alnus acuminata* var. *genuina* Regel, 1861; *Alnus acuminata* var. *ferruginea* (Kunth) Regel, 1861; *Alnus acuminata* var. *zorullensis* (Kunth) Regel, 1861; *Alnus acuminata* var. *mirbelii* (Spach) Regel, 1861; *Alnus acuminata* var. *spachii* Regel, 1865; *Alnus acuminata* var. *cuprea* Bartlett, 1909; *Alnus acuminata* var. *subsericea* Bartlett, 1909; *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (Schlecht.) Furlow, 1976 [1977].

2.2.2 Nombres comunes de *Alnus acuminata*

Como ya se mencionó, es una especie nativa de Latinoamérica que se encuentra desde México hasta Argentina (Figura 3). Por lo que tiene diferentes denominaciones, dependiendo de la región en la cual se encuentre: aliso, aile o ilite (México, Argentina, Colombia, Ecuador y Perú); ramrán, lambdn (Guatemala, Costa Rica y Perú); jaúl (Costa Rica); palo de lama (Guatemala); cerezo y chaquiro (Colombia) (http://www.winrock.org/firm/factnet/factpub/FACTSH/A_acuminata.html).

En México se le conoce en el estado de Chiapas con el nombre de ilite, en Yucatán como aile, en Veracruz como abedul o aliso y en Tabasco como palo de águila (Martinez, 1984)

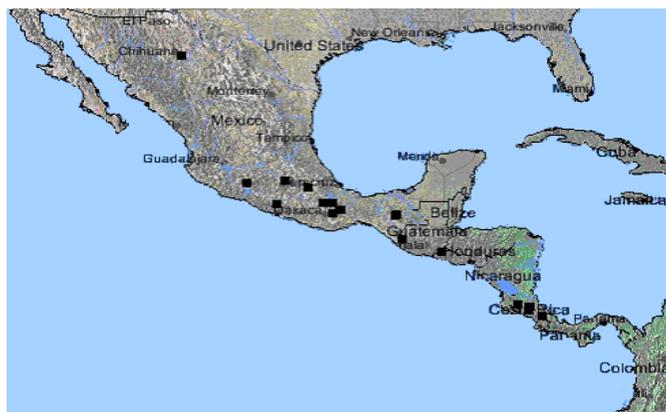


Figura 3 .- Distribución de *A. acuminata* en México y Centroamérica



2.2.3 Distribución y ecología de *A. acuminata*

Es una especie originaria de México y Centroamérica. Se extiende desde el noroeste de México hasta el norte de Argentina, los Andes de Perú y Bolivia. Se ha introducido con éxito en el sur de Chile y en Nueva Zelanda. En México, se encuentra principalmente en los estados de Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Estado de México, Oaxaca, Querétaro y Veracruz.

Prospera en las riveras de los ríos y en pendientes húmedas, se desarrolla en áreas de neblina frecuente. Su rango de temperatura oscila entre 4 y 27 °C y puede soportar temperaturas que bajan temporalmente a 0 °C; precipitación de 1,000 a 3,000 mm o más. Suelos limoso de origen aluvial o volcánico, profundo, bien drenado, cambisol vértico y eútrico, de textura mediana, rico en materia orgánica, grava, arena, y arcilla.

Es una especie importante en los procesos de regeneración de los bosques. Los ailes son catalogados como especies pioneras, se desarrollan bien en sitios ecológicamente perturbados y favorecen el establecimiento de otras especies dada su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico. Esto es debido principalmente a que en los nódulos fijadores de nitrógeno de sus raíces, se encuentra el simbiote actinomiceto *Frankia* sp. (*Franki alni*) por lo cual *Alnus* posee una fuerte actividad para fijar nitrógeno (279 kg/ha).

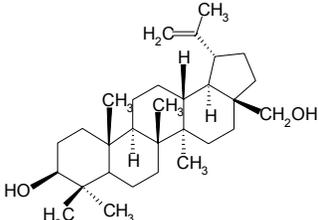
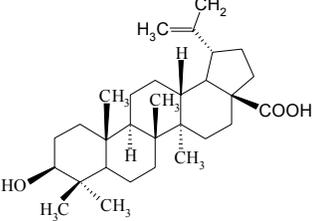
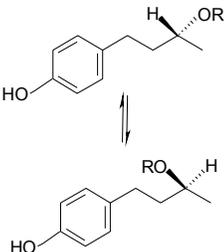
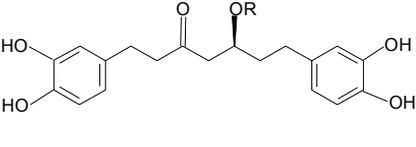
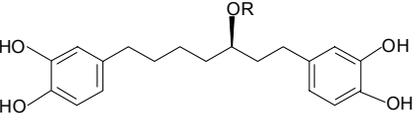
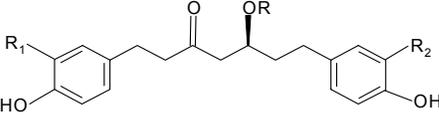
2.3.- Composición química del genero *Alnus*

El genero *Alnus* posee numerosos compuestos químicos, algunos de ellos de destacado interés medicinal como diarilhetpanoides y triterpenoides (González, 1998). La corteza de algunas de sus especies presenta alquitrán, α -betulenol y β -betulenol, ácido betulínico y betulina (Mañes *et al.*, 1997) además es fuente importante en la obtención de resina, de esteroides (β -sitosterol) y de compuestos de estructura fenólica tales como: rhododendrina, oregonina, miricetina, delfinidina y ácido elágico. Cabe destacar que algunos de los compuestos antes mencionados son utilizados por sus características, para clasificar

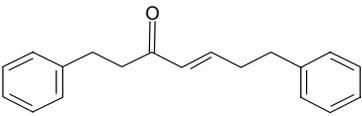
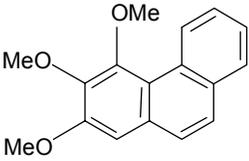
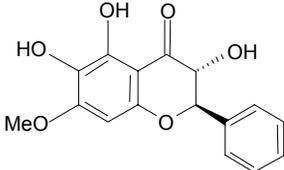
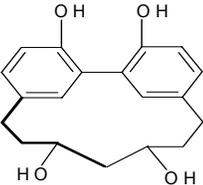
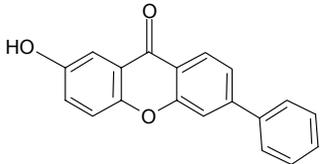
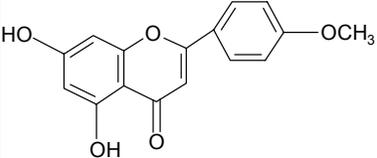
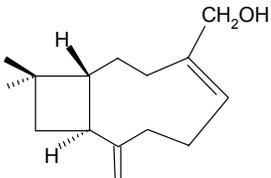
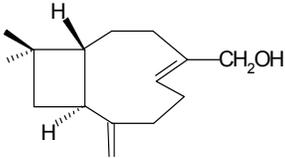


quimiotaxonómicamente a las distintas especies (Evans, 1985). Finalmente, es importante destacar que las hojas son importantes pues de éstas se extrae un flavonoide (la acetina).

En la siguiente tabla (Tabla 3) se presentan algunos de los metabolitos secundarios más estudiados e importantes encontrados hasta la fecha en este género:

Nombre Químico	Fórmula	Referencia
Betulina; Betulol; Betulinol; Trochol: 20(29)-lupeno-3 β ,28-diol		Evans, 1985. Harborne, 1991. Duke, 1992. Mañes <i>et al.</i> , 1997. Huguet <i>et al.</i> , 2000.
Ácido betulínico: ácido 3 β -hidroxi-20(29)- lupen-28-oico.		Galgon <i>et al.</i> , 1999. Duke, 1992. Huguet <i>et al.</i> , 2000. Mañes <i>et al.</i> , 1997. Steele <i>et al.</i> , 1999.
(-)-Rododendrol: R = H Rododendrina: R = Glc (+)-Rododendrol: R = H Rododendrina: R = Glc		Harborne, 1991. Santamour <i>et al.</i> , 1997. Klischies <i>et al.</i> , 1978.
Hannoquina R = Xil R = H		Min-Won <i>et al.</i> , 2000.
Oregonina R = Xil R = Glc		Min-Won <i>et al.</i> , 2000.
Platipilósida R ₁ = GlcPir, R ₂ = H R ₁ = GlcPir, R ₂ = OH R ₁ = Xil, R ₂ = H R ₁ = H, R ₂ = H		Chen <i>et al.</i> , 2000. Matsuda <i>et al.</i> , 1998.



Deshidroyaskabushiquetol		Tori <i>et al.</i> , 1995.
2,3,4-Trimetoxifenatreno		Tori <i>et al.</i> , 1995.
Alnustinol		Duke, 2000.
Alnusdiol		Hanawa <i>et al.</i> , 1997.
Glutanxona		Peres <i>et al.</i> , 2000.
Acacetina; Linaringenina: 4-metil éter apigenina		Harbone, 1991 Evans, 1985. Keinänen <i>et al.</i> , 1998.
α -betulenol		Demirci <i>et al.</i> , 2000. Evans, 1985.
β -betulenol		Demirci <i>et al.</i> , 2000. Evans, 1985



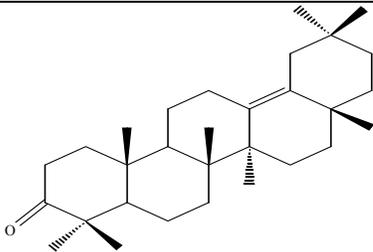
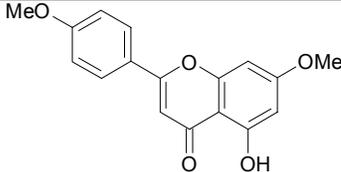
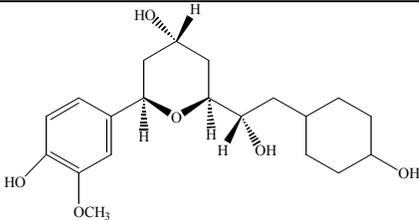
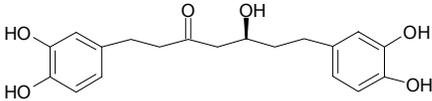
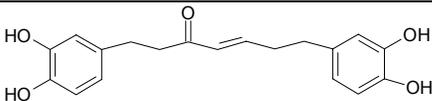
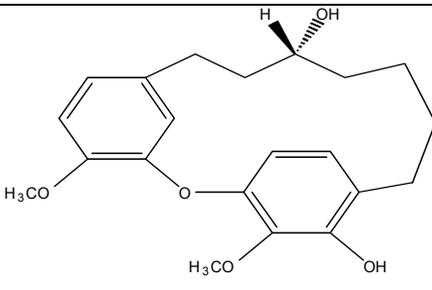
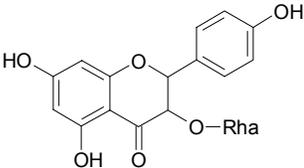
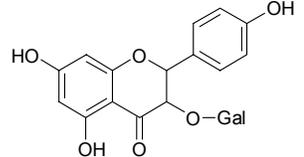
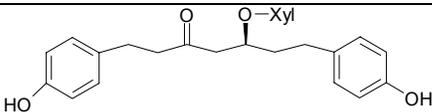
δ -amirona		Salama <i>et al.</i> 2005
4',7-dimetoxiapigenina		Salama <i>et al.</i> 2005
Roiptelol		KiHwan <i>et al.</i> 2007
Hirsutanolol		KiHwan <i>et al.</i> 2007
Hirsutanona		KiHwan <i>et al.</i> 2007
2-oxatrycyclo[13.2.2.13,7]eicosa-3,5,7(20),15,17,18-hexaen-10-16-diol		KiHwan <i>et al.</i> 2007
Afelina		Kuroyanagi <i>et al.</i> 2005
Isohiperóxido		Kuroyanagi <i>et al.</i> 2005
Platifinolol-5-O- β -D-xylopiranosido		Kuroyanagi <i>et al.</i> 2005

Tabla 3.- Metabolitos más importantes encontrados en especies de *Alnus*



2.4.-Usos de *A. acuminata* (http://www.arboles.org/paginas/alnus_acuminata.html):

En general, el uso principal que se le da a esta especie en Latinoamérica es

- **Artisanal:** Para fabricar adornos, herramientas, figuras talladas, etc.

- **Agroforestal:** Es muy utilizada ya que al ser buena fijadora de nitrógeno (279 kg/ha) se utiliza para mejorar los lugares donde pastan las vacas y además se usa como sombra para sembradíos de café.

- **Ecológico:** Es como ya se mencionó, una de las plantas más importantes en cuanto a fijación de nitrógeno atmosférico al suelo, por lo cual se propone en algunos estudios para mejorar ciertos habitats y regiones.

- **Industrial:** Se utiliza para fabricar muebles, gabinetes, tableros, decoraciones o juguetes, la corteza es astringente por lo que se utiliza como curtiente y colorante, también se utiliza para la elaboración de pulpa para el papel.

- **Medicinal:** Se utiliza en medicina tradicional para curar escrófulas, enfermedades venéreas, inflamación de garganta, infección de vías urinarias, contra el reumatismo, antiinflamatorio y como expectorante (Martínez, 1984).

2.5 Actividad biológica del genero *Alnus* :

Dentro de este género existen varias especies que poseen actividad medicinal, sólo se mencionarán las mas importantes y a las cuales se les han hecho estudios de actividad biológica:



Especie	Actividad biológica
<p data-bbox="407 331 607 365"><i>Alnus japonica</i></p> 	<p data-bbox="818 390 1430 751">Especie nativa de Japón altamente utilizada en la medicina tradicional de ese país, se le ha demostrado una potente actividad antioxidante por parte de un extracto metanólico de las hojas; entre los compuestos encontrados responsables de la actividad, está la oregonina (Kuroyanagi <i>et al.</i> 2005).</p>
<p data-bbox="337 827 675 861"><i>Alnus hirsuta</i> var. <i>sibirica</i></p> 	<p data-bbox="818 886 1430 1247">Especie asiática que se distribuye por China y Corea del Sur, ha sido utilizada en la medicina tradicional de estos países para el tratamiento de cáncer de mama, se ha descubierto que los compuestos aislados de la corteza son potentes antiinflamatorios, por inhibición de la ciclooxigenasa-2 (Min-Won <i>et al.</i> 2000).</p>
<p data-bbox="428 1377 586 1411"><i>Alnus rubra</i></p> 	<p data-bbox="818 1436 1430 1747">Especie nativa de Canadá utilizada para infecciones fúngicas y bacterianas, se han podido aislar de la corteza y de las hojas sustancias antibacteriales y ha demostrado ser eficaz contra el cáncer de piel (Chen <i>et al.</i> 2000).</p>



<p style="text-align: center;"><i>Alnus hirsuta</i></p> 	<p>Esta especie se encuentra desde Rusia hasta Japón, en donde es altamente utilizada en la medicina tradicional sobre todo para hemorragias y diarrea; en recientes estudios se ha encontrado que tiene triterpenos, taninos y diarilheptanoides con una notoria actividad citotóxica y antioxidante, además de que se han aislado de la corteza varios diarilheptanoides que han demostrado tener una actividad inhibitoria en la síntesis de óxido nítrico y en la producción del factor de necrosis tumoral-α (KiHwan <i>et al.</i> 2007).</p>
<p style="text-align: center;"><i>Alnus incana</i></p> 	<p>Especie de Canadá utilizada por los nativos de esa región para tratamientos de infecciones, ha demostrado actividad anticancer <i>in vitro</i> (Ritch-Krc <i>et al.</i> 1996).</p>
<p style="text-align: center;"><i>Alnus acuminata</i></p> 	<p>Esta especie es utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento del reumatismo, como antiinflamatoria, para combatir escrófulas, enfermedades infecciosas, y como expectorante; se le han hecho estudios <i>in vivo</i> en los que extractos de la corteza presentaron actividad antiinflamatoria (Rovelo, 2002) y algunos compuestos aislados a partir de las hojas demostraron tener actividad abortiva (Salama <i>et al.</i> 1996).</p>



2.5.1 Actividad biológica de *Alnus acuminata* ssp *arguta* (Schlecht.) Furlow

Como ya se ha mencionado anteriormente, *A. acuminata* ssp. *arguta* es una planta con numerosos usos medicinales, cabe mencionar que es altamente utilizada en la medicina tradicional mexicana sobre todo del sureste del país. La corteza se utiliza para curar escrófulas, enfermedades venéreas, inflamación de garganta, de vías urinarias, para tratar el reumatismo, como astringente, para curar síntomas de inflamación en general y además como expectorante (Martínez, 1984).

Por lo general se utiliza la infusión de la corteza 3 veces al día. Para los problemas de la garganta se prescriben gárgaras; en otros casos se utiliza en forma de cataplasma como antiinflamatorio y astringente. Cabe mencionar que también la infusión de las hojas es utilizada contra escrófulas y enfermedades venéreas, sobre todo en la medicina tradicional de Sudamérica. Dentro de los pocos estudios realizados en esta especie, se ha comprobado actividad antiinflamatoria *in vivo* en ratas Wistar tanto a compuestos aislados de hojas (Salama *et al.*, 2005) como al extracto metanólico de la corteza (Rovelo, 2002). Por otra parte también se ha reportado una fuerte actividad abortiva de compuestos aislados de las hojas (Salama *et al.* 1996).

Finalmente se destaca la existencia en el mercado internacional de una patente para una mezcla de extractos hidroalcohólicos de *Phytolacca americana* y *Alnus acuminata*, registrada en el departamento de patentes de la Unión Europea en el 2006, para el tratamiento y cura de la psoriasis y todas sus formas patológicas y cuyo nombre comercial es Skaskahs (Pat. # WO2006014100 European PatentOffice), además en cuanto al carácter nacional esta mezcla también esta patentada y registrada ante la Secretaría de Salud bajo el permiso sanitario 011RH/2003 SSA, con el numero de registro de patente Mexicano 243578.



2.6.- Inflamación.

2.6.1.- Generalidades sobre el proceso inflamatorio

La palabra inflamación deriva del latín “*flama*”, que significa fuego. *Inflammare* significa prenderse o encenderse. Se entiende por inflamación al conjunto de mecanismos involucrados en la respuesta del organismo frente a una agresión, encaminados a eliminar al agente agresor y reparar el daño. La inflamación es una respuesta patológica/fisiológica fundamental diseñada para eliminar los estímulos nocivos inducidos en el huésped, que incluyen agentes químicos (toxinas, sustancias cáusticas) patógenos y endógenos (como aquellos producidos por el propio sistema inmune) así como para reparar las lesiones por radiaciones y quemaduras, entre otros, es decir, la respuesta inflamatoria se encuentra relacionada con el proceso de reparación de tejidos (Clark y Johnson, 1997).

Muchas de las características típicas de la reacción inflamatoria se describieron ya en épocas tan tempranas como el año 1600 A.C., en escritos de papiros egipcios. En el siglo I D.C., el médico romano Celsus describió los “cuatro signos cardinales de la inflamación”: rubor (enrojecimiento), tumor (hinchazón), calor y dolor. Ya en el siglo II DC, el médico y químico Galeno, añadió un quinto signo *functio laesa* (pérdida de la función). Los signos cardinales de la inflamación reflejan los tres principales fenómenos de una reacción inflamatoria:

1.- La vasodilatación de capilares cercanos ocurre a medida que se contraen los vasos que eliminan sangre del área afectada y su consecuencia es una ingurgitación de la red capilar, los capilares ingurgitados propician el enrojecimiento del tejido (eritema) y elevación de la temperatura de la piel.

2.- Aumento de la permeabilidad capilar, esto es, para facilitar una afluencia de líquido a la zona y de células de los capilares ingurgitados hacia el tejido, este líquido es acumulado y tiene un contenido alto en proteínas; la acumulación de este líquido contribuye a la tumefacción del tejido (edema).



3.- La afluencia de fagocitos de los capilares hacia los tejidos promueve el incremento de la permeabilidad de los capilares. La migración de fagocitos es un proceso de múltiples etapas que incluye la adherencia de las células a la pared endotelial de los vasos sanguíneos (marginación), posteriormente la migración entre las células endoteliales de los capilares hacia el tejido (diapédesis) y por último, a través del tejido hasta el sitio de invasión (quimiotaxis). Finalmente el dolor se debe a la activación del sistema de las cininas y de las prostaglandinas.

La inflamación se divide en aguda y crónica en términos de su duración. En general la reacción inflamatoria aguda tiene un inicio rápido y dura poco y suele acompañarse de una respuesta generalizada que se conoce como fase aguda. Cabe destacar que en algunas enfermedades la activación inmunológica persistente puede ocasionar inflamación crónica, que a menudo tiene consecuencias patológicas como desencadenar la destrucción del tejido y por lo tanto presentar pérdida de la funcionalidad de la parte afectada (Goldsby, 2004).

2.6.2 Mediadores de la inflamación

Se denomina así a una serie de compuestos que actúan como mensajeros entre las células involucradas en la respuesta inflamatoria y que son producidos directa o indirectamente por éstas o se derivan de otros factores humorales. Se dividen para una mayor sencillez en dos grupos: los primarios, que pueden ser de origen celular o humoral y los secundarios, que únicamente son de origen celular (www.whfreeman.com/immunology5e).

Mediadores primarios de origen humoral: Son derivados de sistemas como el complemento, coagulación y cininas. De la activación del complemento se originan anafilatoxinas como C3a, C4a y C5a, e inducen desgranulación del mastocito y liberación de histamina; del sistema de coagulación se origina fibrina y plasmina y del sistema de cininas (que es activado por un factor de la coagulación del plasma), se originan el factor de Hageman, y la bradicinina la cual induce el dolor, produce vasodilatación, contracción de músculo liso y aumenta permeabilidad celular.



Mediadores primarios de origen celular: Se encuentran en gránulos citoplasmáticos de células fagocíticas y de los mastocitos. De los fagocitos se generan la lactoferrina que induce la producción de radicales hidroxílicos, la catepsina G que actúa sobre el complemento, así como la elastasa y colagenasa (ambos dañan tejidos) (Goldsby, 2004).

Mediadores secundarios: la síntesis de estos mediadores principia una vez que se ha iniciado la respuesta inflamatoria. De los macrófagos se origina la interleucina-1(IL-1), responsable de reacciones de fase aguda de la inflamación, Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) que también participa como mediador de las reacciones de fase aguda y presenta efecto citotóxico sobre ciertas células tumorales (Goldsby, 2004).

Del metabolismo del oxígeno activado por degranulación de los elementos polimorfonucleares se originan el superóxido ($\cdot\text{O}_2$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxílicos ($\cdot\text{OH}$).

Posterior a las perturbaciones de la membrana, fosfolípidos de diversas clases se degradan hasta ácido araquidónico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico) y se sintetizan varios eicosanoides (prostaglandinas [PG's], leucotrienos [LT's] y tromboxanos [TX's]). Los eicosanoides son productos de oxidación de ácidos grasos principalmente el araquidónico; el metabolismo del ácido araquidónico puede ocurrir por la vía de la ciclooxigenasa (produce prostaglandinas y tromboxanos), o por la vía de la lipooxigenasa para producir cuatro leucotrienos (Figura 4 y Esquema 1).

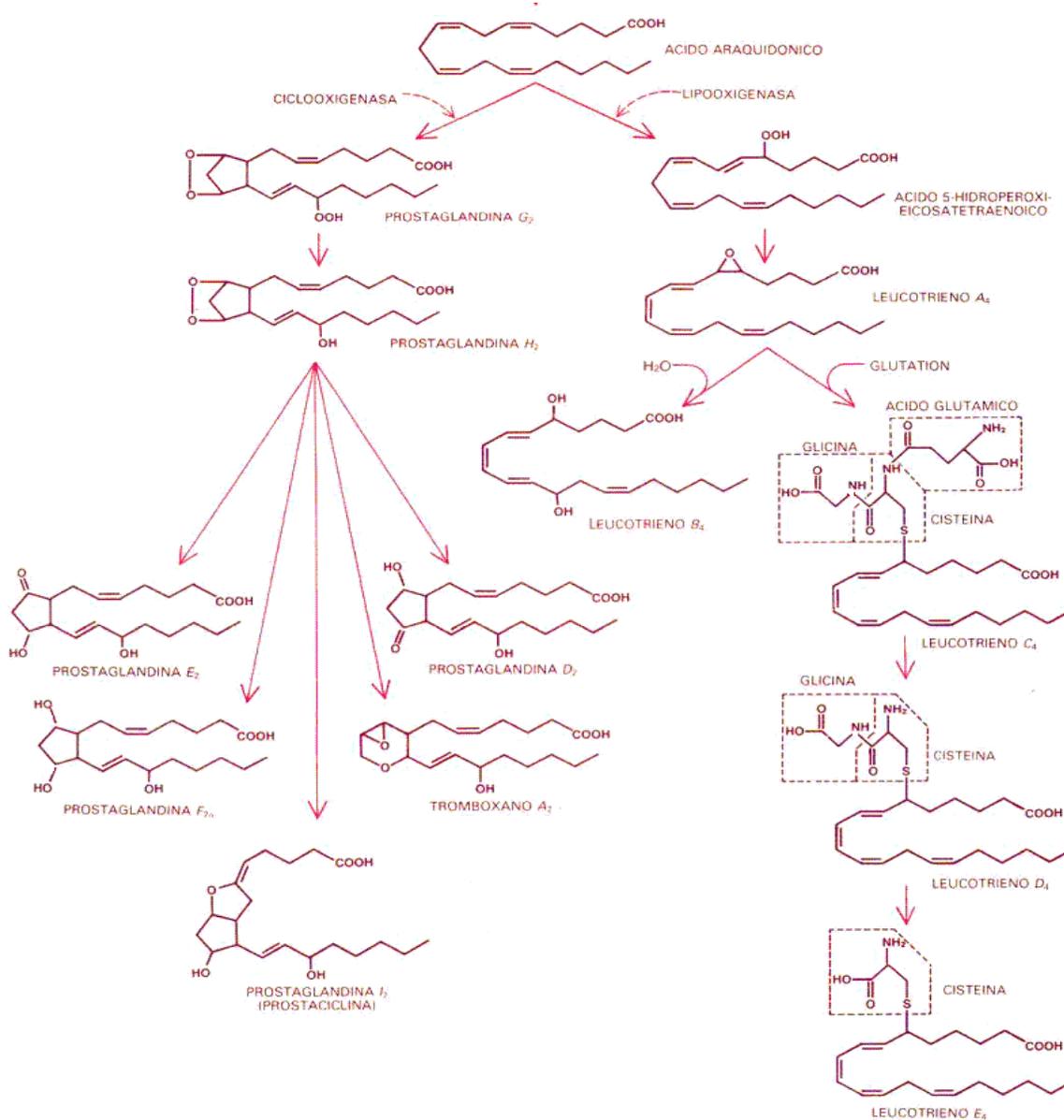


Figura 4. Metabolismo del ácido araquidónico

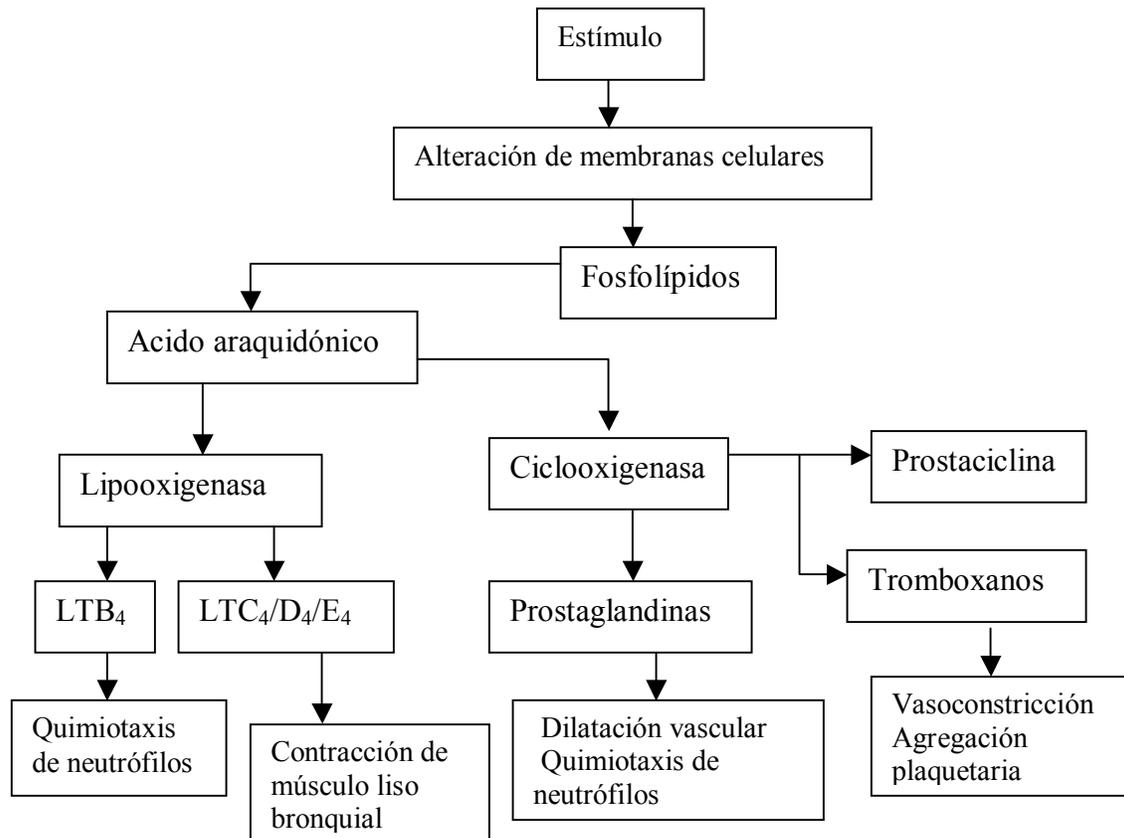
- *Las prostaglandinas:* Deben su nombre a que en un principio se pensó que se originaban en la glándula prostática; sin embargo se sabe que están ampliamente distribuidos en todos los tejidos y líquidos corporales, la estructura básica es un ácido carboxílico de 20 átomos de carbono que contiene un ciclopentano entre C-8 y C-12 y un hidroxilo en C-15. Se biosintetizan a partir del ácido araquidónico por acción de la prostaglandina endoperoxidasa de la cual existen dos isoformas: PGH sintetasa-1 (COX-1) y PGH sintetasa-2 (COX-2); COX-1 tiene actividad homeostática y COX-2 se induce durante el proceso



inflamatorio, las prostaglandinas que actúan como mediadores de la inflamación son PGE₂, PGI₂ y PGD₂ que son responsables de incrementar la permeabilidad vascular, inducción de la quimiotaxis en neutrófilos y vasodilatación, además a nivel hipotálamo PGE₂ se produce por el estímulo de IL-1 y produce una respuesta febril (Goldsby, 2004).

- *Los tromboxanos*: Se derivan también del ácido araquidónico por vía de la ciclooxigenasa; el TXA₂ es el mediador de la inflamación más importante de esta familia, son responsables de agregación plaquetaria y vasoconstricción sanguínea.

- *Los leucotrienos*: Se derivan también del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la lipooxigenasa y se generan cuatro leucotrienos LTB₄, LTC₄, LTD₄ y LTE₄; los tres últimos constituyen en conjunto lo que antes se llamaba sustancia de anafilaxia de reacción lenta e inducen la contracción del músculo liso, y el LTB₄ es un quimioatrayente poderoso de neutrófilos.



Esquema 1. Reacciones de alteración de membrana.



2.6.3.- Inflamación aguda (Goldsby, 2004)

La reacción inflamatoria localizada, ocurre minutos después de que la reacción tisular se produce y está basada principalmente en los “cuatro signos cardinales de la inflamación”, se acompaña de una respuesta sistémica o general conocida como reacción de fase aguda, se caracteriza por inducción de fiebre, aumento de síntesis de hormonas como la hidrocortisona, elevación de la producción de leucocitos y elaboración de gran cantidad de proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva (que activa el complemento) o la proteína fijadora de manosa.

Muchos de los efectos generales de la fase aguda se deben a la acción combinada de diferentes citosinas como interleucina-6 (IL-6) o TNF- α , que actúan sobre el hipotálamo para inducir una reacción febril por producción de prostaglandinas, inducen al hígado a producir proteínas de fase aguda y pueden causar por estimulación de la médula ósea (hematopoyesis) un aumento transitorio de leucocitos necesarios.

2.6.4.- Inflamación crónica

Cuando un antígeno persiste, se desarrolla una respuesta inflamatoria crónica que resulta en una lesión tisular grave; la acumulación y la activación de macrófagos constituye la piedra angular de este tipo de inflamación, las citosinas liberadas por macrófagos activados de manera crónica estimulan la proliferación de fibroblastos y la producción de colágena. Dos citosinas, en particular interferón- γ (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), desempeñan un papel importante en el desarrollo de esta inflamación, el IFN- γ activa macrófagos y éstos liberan diversas enzimas hidrolíticas de oxígeno reactivo e intermediarios de nitrógeno que causan gran parte del daño de los tejidos circundantes, el TNF- α contribuye importantemente en la emaciación tisular, ambas citosinas aumentan la adherencia intercelular lo cual facilita el reclutamiento de grandes números de células en la reacción inflamatoria crónica (www.whfreeman.com/immunology5e).



2.7.- Agentes antiinflamatorios (Goldsby, 2004)

Se dispone de diversas modalidades terapéuticas para reducir las reacciones inflamatorias prolongadas así como las complicaciones colaterales. Recientemente se ha intentado bloquear con anticuerpos la actividad de diversas moléculas de adherencia para reducir la acumulación de neutrófilos.

Existen también los corticosteroides (agentes antiinflamatorios esteroideos AIE's) que son derivados del colesterol y que incluyen prednisona, prednisolona y metilprednisolona, estos son poderosos agentes antiinflamatorios y ejercen efectos diversos como la disminución en el número de linfocitos circulantes (principalmente por linfolisis), así como la capacidad fagocítica y destructiva de macrófagos y neutrófilos, y se cree que inhiben el factor de transcripción kappa B (NF- κ B) en el citosol impidiendo que active diversos genes inclusive los que participan en la activación de las células T y la producción de citosinas, lo cual contribuye a su efecto antiinflamatorio.

2.7.1 Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (FAINE's)

Desde los tiempos de Hipócrates se empleaban extractos de corteza de sauce para aliviar el dolor. El ingrediente activo de estos extractos es la salicina transformada por semisíntesis en la aspirina. Este es sólo un ejemplo de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (FAINE's). Los FAINE's tienen como mecanismo principal inhibir la formación de prostaglandinas y tromboxanos por inhibición de la vía de la ciclooxigenasa; la reducción de la producción de prostaglandinas limita el aumento de la permeabilidad vascular y la quimiotaxis de los neutrófilos en la reacción inflamatoria, aunque cabe destacar, que los FAINE's no inhiben los productos del ácido araquidónico vía lipooxigenasa.

Aunque numerosos FAINE's como la aspirina, naproxeno, ibuprofeno, paracetamol, indometacina, piroxicam, etc. (Ver Anexo A) se prescriben en problemas tan diversos como la artritis, esguinces y traumatismos tisulares, ejercen efectos gastrointestinales adversos, llegando en los casos más graves a hemorragias o perforación gástrica, esto debido a que la



gran mayoría de los FAINE's inhiben las COX-1 y COX-2; la inhibición de la primera es lo que produce las lesiones antes mencionadas y carece de efectos antiinflamatorios razón por la cual se ha tenido que investigar la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios que inhiban únicamente a COX-2; razón por la cual los tratamientos herbolarios presentan una nueva perspectiva en esta búsqueda (Goldsby, 2004).

2.8.- Modelo de inflamación inducido por carragenina

Los modelos inflamatorios en animales de laboratorio, permiten valorar la potencia y la efectividad antiinflamatoria de los fármacos o sustancias de origen vegetal y agentes antiartríticos de manera cuantitativa. Aunque los estudios *in vitro* están muy de moda actualmente, un estudio *in vivo* permite estudiar más a fondo la actividad del compuesto en todo un conjunto de tejidos directamente y no en un receptor aislado a diferencia de los estudios *in vitro*. El modelo de inflamación inducida por carragenina, es uno de los mas utilizados para desarrollar edema en modelos animales (Syntex, 1987) ya que: es altamente reproducible, la evolución de la inflamación es similar a la experimentada en el hombre en patologías donde participe la inflamación crónica (tales como la artritis reumatoide), permite además la valoración cuantitativa de la inflamación producida, y puede emplearse como un modelo de trastornos inflamatorios sean estos de tipo agudo, subagudo o crónico.

La carragenina es una mezcla de polisacáridos sulfatados extraídos de algas marinas rosas (Rhodophyceae), posee dos familias estructurales: λ (forma no gelatinizante), ι y κ (formas gelatinizantes); las mas utilizadas para inducir edema en los modelos experimentales son λ y κ debido a las propiedades gelatinizantes que les confiere la estructura terciaria de las mismas.

La dosis para producir el efecto inflamatorio agudo de carragenina varía entre 0.05 y 0.1mL de una suspensión de carragenina en solución salina al 1% aunque puede haber variabilidad con relación a los experimentos y al tipo de carragenina empleado, la vía de administración es la subcutánea en el cojinete plantar de la pata trasera de la rata, y el efecto máximo se



alcanza entre las 3-5 horas posteriores a la administración de carragenina y puede permanecer el efecto varias horas (Mañes, 1999).

La biocinética de la carragenina se caracteriza por una curva biexponencial donde se distinguen dos procesos, una primera fase en la cual el incremento del volumen del miembro lesionado alcanza un máximo y una segunda fase de disminución de la inflamación. El mecanismo de producción del edema ha sido ampliamente estudiado, se ha encontrado que es causado en una primera etapa por la liberación de histamina, serotonina y elementos del complemento, y en una segunda fase (2 a 3 horas posteriores al estímulo lesivo) por la producción de prostaglandinas, bradicinina y 5-hidroxitriptamina así como por la presencia de leucocitos (Winter y Risley, 1962). Por lo anterior se utilizan como fármacos de referencia los FAINE's por el mecanismo de inhibición de síntesis de prostaglandinas de los mismos, además de que si existiera actividad antiinflamatoria por parte de algún fármaco o extracto de referencia se puede proponer este mismo mecanismo de acción.

Otros mediadores involucrados en el mantenimiento del edema causado por carragenina, son los radicales libres de oxígeno, estas moléculas generadas enzimáticamente a partir de macrófagos activados y células endoteliales conducen al incremento en la permeabilidad vascular, infiltración celular y daño tisular; muchos efectos antiinflamatorios son por este aspecto ponderados por la actividad antioxidante.

2.9.- Productos naturales como agentes antiinflamatorios

La medicina moderna ha contribuido en gran medida a detener la progresión y daño causado por enfermedades infecciosas, de hecho la medicina moderna ha sido muy exitosa en los tratamientos aplicados a enfermedades agudas, sin embargo es en las enfermedades crónicas en las que la medicina moderna así como los fármacos modernos han tenido escasos resultados, por lo que los tratamientos con productos naturales (probióticos, productos de origen animal, factores nutricionales, y productos herbolarios) han emergido actualmente como nuevas alternativas de tratamientos (Haddad, 2005).



En específico, en el caso de la medicina herbolaria la industria farmacéutica mundial ha mostrado particularmente un gran interés, como por ejemplo, en la creación del Instituto de Medicina China se invirtieron 64 millones de dólares y se estima que en años recientes la industria farmacéutica americana destinó cerca de 4 billones de dólares en investigación, estudio e introducción de medicinas herbolarias (Plaeger, 2003).

Muchas preparaciones herbolarias alteran la función inmune y despliegan un gran número de efectos inmunomoduladores; en varios estudios *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que pueden afectar y modular la secreción de citosinas, la liberación de histamina, la secreción de inmunoglobulinas, la expresión celular de coreceptores, proliferación linfocítica, y actividad citotóxica, por sólo mencionar algunos de los ejemplos mas representativos.

Gran cantidad de moléculas con actividad antimicrobiana y con un alto potencial inmunomodulador han sido recientemente descubiertas (Anexo B), y pudieran ser fácilmente tomadas como ejemplos por los químicos sintéticos para optimizarlas y obtener moléculas con mayor actividad. Sus estructuras incluyen un gran rango que abarca desde isoflavonoides, índoles, fitoesteroles, polisacáridos, sesquiterpenoides, triterpenoides, alcaloides, glucanos y taninos (Pathwardhan, 2005).

Algunas plantas que actualmente presentan gran futuro en el aspecto inmunomodulador son entre otras *Glycyrrhiza glabra* (antiinflamatoria), *Uncaria tomentosa* (actividad antiinflamatoria por inhibición de TNF- α), *Echinacea spp.* (inmunoestimulante), *Withania somnifera* (reduce niveles de radicales hidroxilos), y *Tinospora cordifolia* (actividad inmunomodulatoria sobre macrófagos) (Pathwardhan, 2005).



3.- OBJETIVOS, HIPOTESIS Y JUSTIFICACION

- Objetivos -

-General -

Evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico así como de las fracciones derivadas del extracto mas activo, de la corteza de *Alnus acuminata ssp. arguta* (Schlecht) Furlow.

- Particulares -

-Obtención de los extractos clorofórmico, hexánico y metanólico a partir de la corteza de *Alnus acuminata ssp. arguta*

-Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico previamente obtenidos, en el modelo de inhibición de la inflamación inducida por carragenina en ratas Wistar.

-Fraccionamiento cromatográfico por columna, del extracto que presente mayor actividad antiinflamatoria, así como el aislamiento en su caso de los metabolitos secundarios presentes en la fracción de mayor actividad.

-Evaluación de la actividad antiinflamatoria de las fracciones derivadas del extracto que presente mayor actividad.

- Confirmación de la actividad antiinflamatoria previamente demostrada (Rovelo, 2002) del extracto metanólico.



- HIPOTESIS -

“Si existieran efectos inhibitorios de la inflamación por parte de la corteza de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (Schlecht.) Furlow entonces se esperará una disminución en el edema inducido por la carragenina en ratas Wistar, sobre todo entre las 3-5 horas posteriores a la administración de los extractos o de las fracciones de esta planta, ya que en este tiempo se alcanza el efecto máximo de la inflamación.”

- JUSTIFICACION -

1) En un estudio farmacológico previo (Rovelo, 2002), se demostró que el extracto metanólico de la corteza de *A. acuminata* posee actividad antiinflamatoria. Esta planta es muy utilizada y comercializada en México como antiinflamatorio, por lo que se justifica el interés por realizar un análisis más profundo de la planta, investigando si esta actividad está presente en extractos de menor polaridad y en fracciones del más activo.

2) Debido a que la inflamación crónica es muy común como repuesta en gran cantidad de patologías, se justifica el hacer una búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios, que pudieran tener una buena eficacia terapéutica y menores efectos colaterales indeseables.

3) En el caso de encontrarse una notable actividad biológica y con el reciente interés de la industria farmacéutica en los fitomedicamentos, la corteza de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* podría eventualmente presentar una alternativa de producción y desarrollo de un fitomedicamento mexicano.



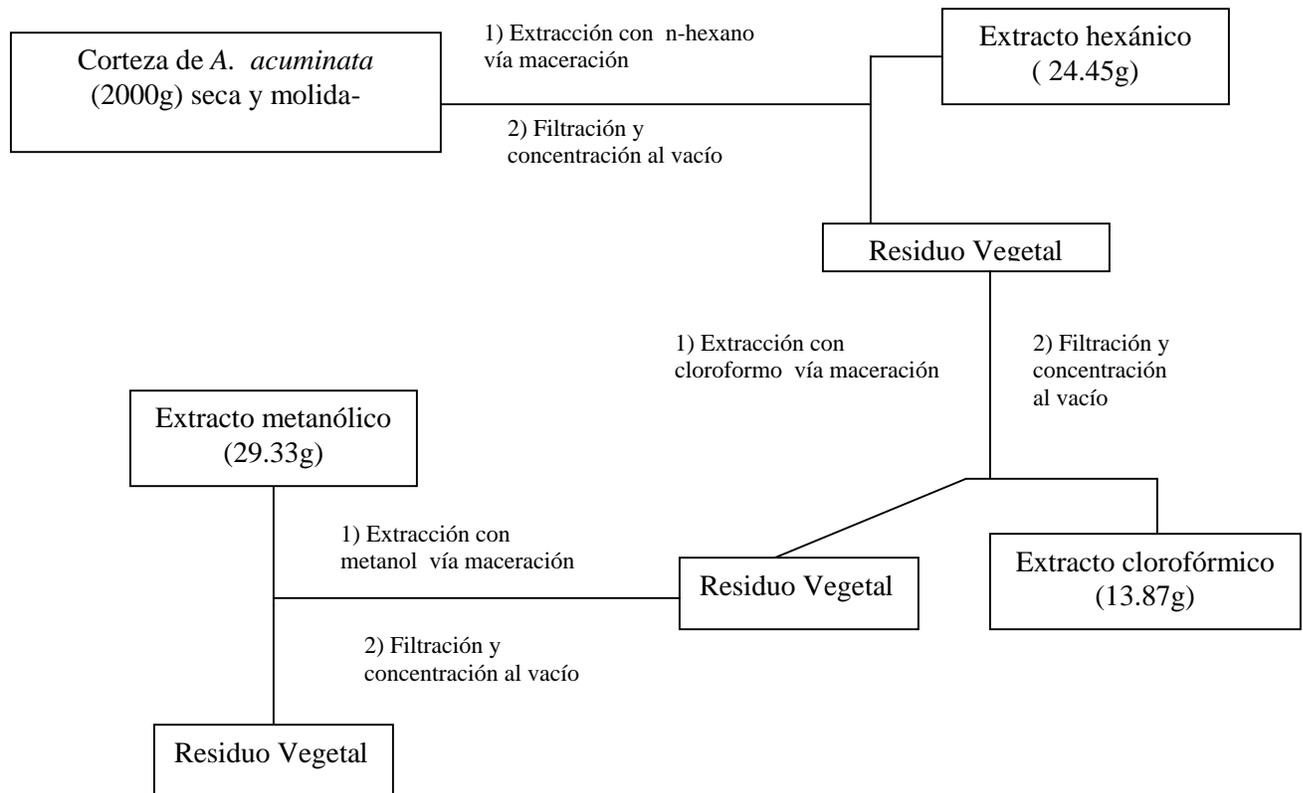
4.- MATERIALES Y METODOS -

4.1.-Material Vegetal :

La corteza de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (Schelcht) Furlow fue colectada en el municipio de Huistán, Chiapas la cual se secó a temperatura ambiente y a la sombra, y se sometió posteriormente al proceso de fragmentación; la identificación del material vegetal fue realizada por el Dr. Mario Ishiki Ishihara del herbario de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), donde se encuentra depositada una muestra de referencia.

4.2.- Preparación de extractos vegetales :

El material vegetal seco y molido (2000g) se extrajo mediante un proceso de maceraciones sucesivas con diferentes disolventes en orden de polaridad ascendente (n-hexano, cloroformo y metanol) a temperatura ambiente (Esquema 2).



Esquema 2. Proceso de obtención de los extractos de la corteza de *A. acuminata* .

4.3.- Evaluación antiinflamatoria utilizando el modelo de inflamación inducida por carragenina en ratas.

La actividad antiinflamatoria de los extractos y de las fracciones fue determinada utilizando el modelo de edema inducido por carragenina en rata descrito por Winter y Risley (1962) como a continuación se detalla.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 180-220 g de peso obtenidas de la compañía Harlan México A.C., las cuales fueron alimentadas *ad libitum* (dieta de laboratorio) y se les permitió libre acceso para beber agua; permanecieron en ciclos de 12/12 horas de luz/oscuridad. Las ratas se pusieron en ayuno 24 horas antes de realizar el estudio. Durante el experimento, no se les proporcionó agua ni alimento. Los animales se pesaron y marcaron con tinta indeleble en la pata trasera derecha (para diferenciar el control



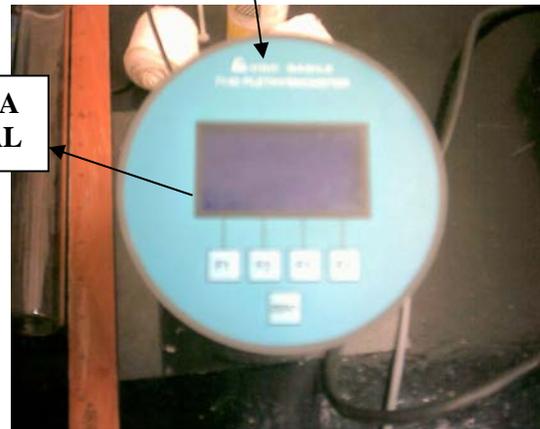
positivo con indometacina la dosis de 100mg/kg y control negativo con el vehículo tween 80 al 0.05% en solución salina isotónica) y fueron numerados secuencialmente con tinta indeleble en la cola. Se utilizaron lotes de 8 ratas para cada dosis y controles. Las muestras de prueba fueron administradas por vía oral mediante la ayuda de una sonda gástrica; todas las dosis de extractos y fracciones probados en el bioensayo, así como los controles fueron administrados 30 min. antes de aplicar 0.1 mL de una suspensión de carragenina al 3% en el cojinete plantar de la pata derecha de la rata (jeringa Plastipack, aguja # 27). A la pata trasera izquierda de cada animal, únicamente se le administró solución salina isotónica, lo que aplicó como control negativo de actividad.

Para medir el edema de la pata del animal se usó un pletismómetro que consiste en un equipo con una celdilla llena de agua dentro de la cual es sumergida la pata de la rata y la cual desplazará un volumen que se registrará a un transductor calibrado a 1 y 2 mL de desplazamiento el cual marcará la diferencia de voltaje referida al volumen desplazado. Este dato aparece en una pequeña pantalla que se encuentra en la parte superior del equipo (Figura 5). Antes del tratamiento a los animales, se determinó el volumen de las patas traseras de cada rata (V_o). Posterior al tratamiento, el volumen promedio (V_t) de 3 o 4 mediciones fue determinado en la pata trasera derecha de cada rata, a las 1, 2, 3, 4 y 5 horas después de la inyección del agente inflamatorio. También fue determinado el volumen de la pata trasera izquierda de cada animal (promedio de 3 o 4 mediciones), a las 1, 3 y 5 horas; estas medidas se utilizaron como control negativo.

La diferencia de las mediciones del volumen de la pata tratada con carragenina a los diferentes tiempos (V_t) con respecto al volumen obtenido antes del tratamiento (V_o), en cada uno de los animales, reflejó la variación del edema.



CELDILLA PARA SUMERGIR LA PATA DE LA RATA



LECTURA DE SEÑAL

TRANSDUCTOR DE SEÑAL PARA MARCAR DIFERENCIA DE VOLTAJE REFERIDA A VOLUMEN DESPLAZADO

Figura 5. Pletismómetro. Plethysmometer UGO Basile (Mod. 7140)



4.4.- Desarrollo del experimento biodirigido. Fraccionamiento de extractos.

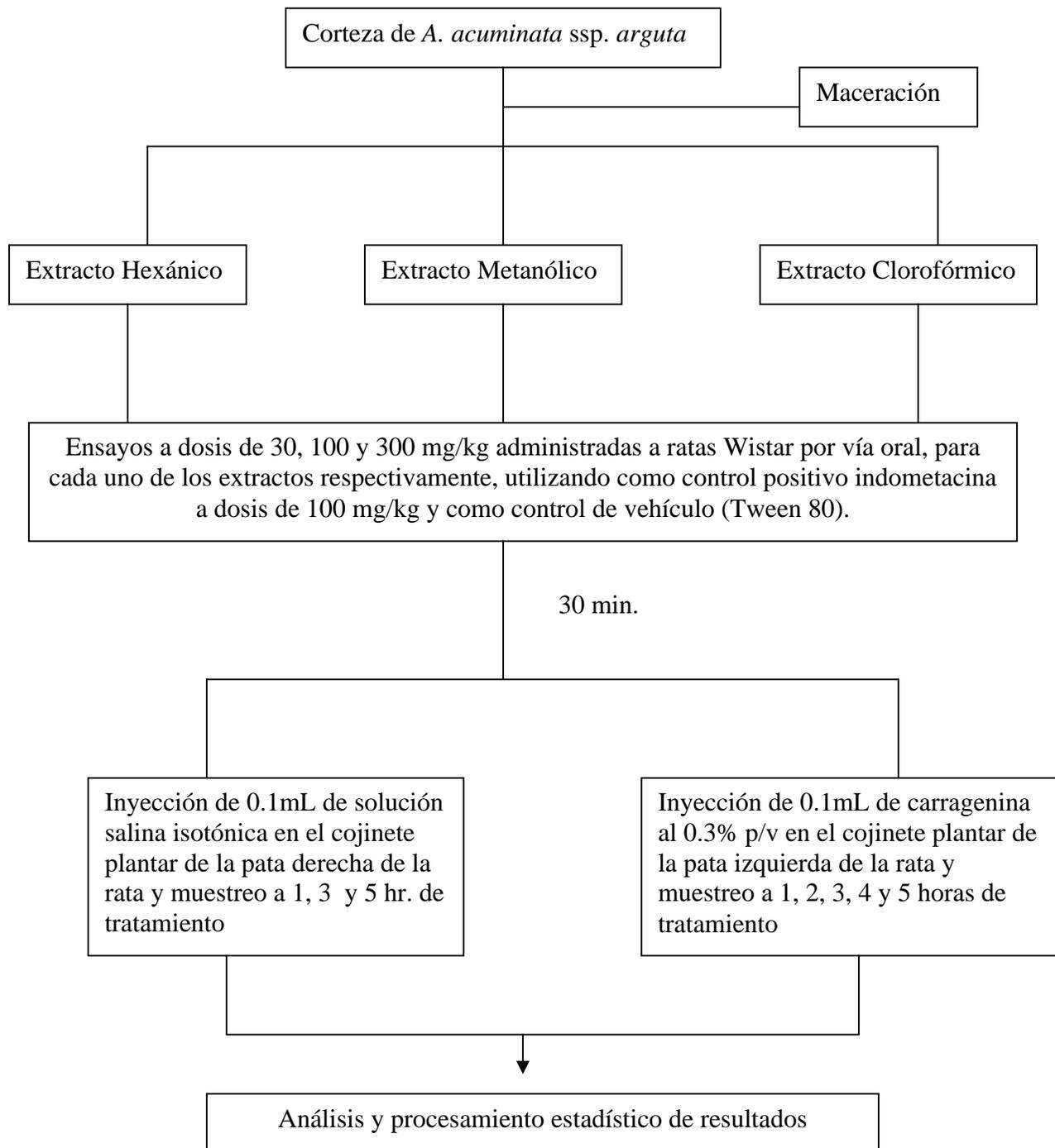
En la primera parte del experimento, se valoró la actividad antiinflamatoria de los extractos (hexánico, clorofórmico y metanólico) utilizando dosis de 30, 100 y 300 mg/kg de peso.

El extracto metanólico activo fue posteriormente ensayado a las dosis de 54.77 y 173.17 mg/kg de peso correspondiente a la media de las dosis. Este mismo extracto (50 g) se preadsorbió en 50 g de gel de sílice y se fraccionó en una columna cromatográfica abierta de gel de sílice (500 g) empleando como disolventes de elución: a) hexano 100%, b) hexano-acetato de etilo 80-20%, c) hexano-acetato de etilo 50-50%, d) acetato de etilo 100% y e) metanol. Las fracciones primarias b), c), d), y e) fueron ensayadas en el modelo de actividad antiinflamatoria antes mencionado a dosis de 300 mg/kg de peso, nuevamente en lotes de 8 ratas, empleando controles positivo y negativo; posteriormente fueron probadas mas dosis de la fracción e) para determinar una concentración efectiva media y trazar una curva dosis-respuesta.

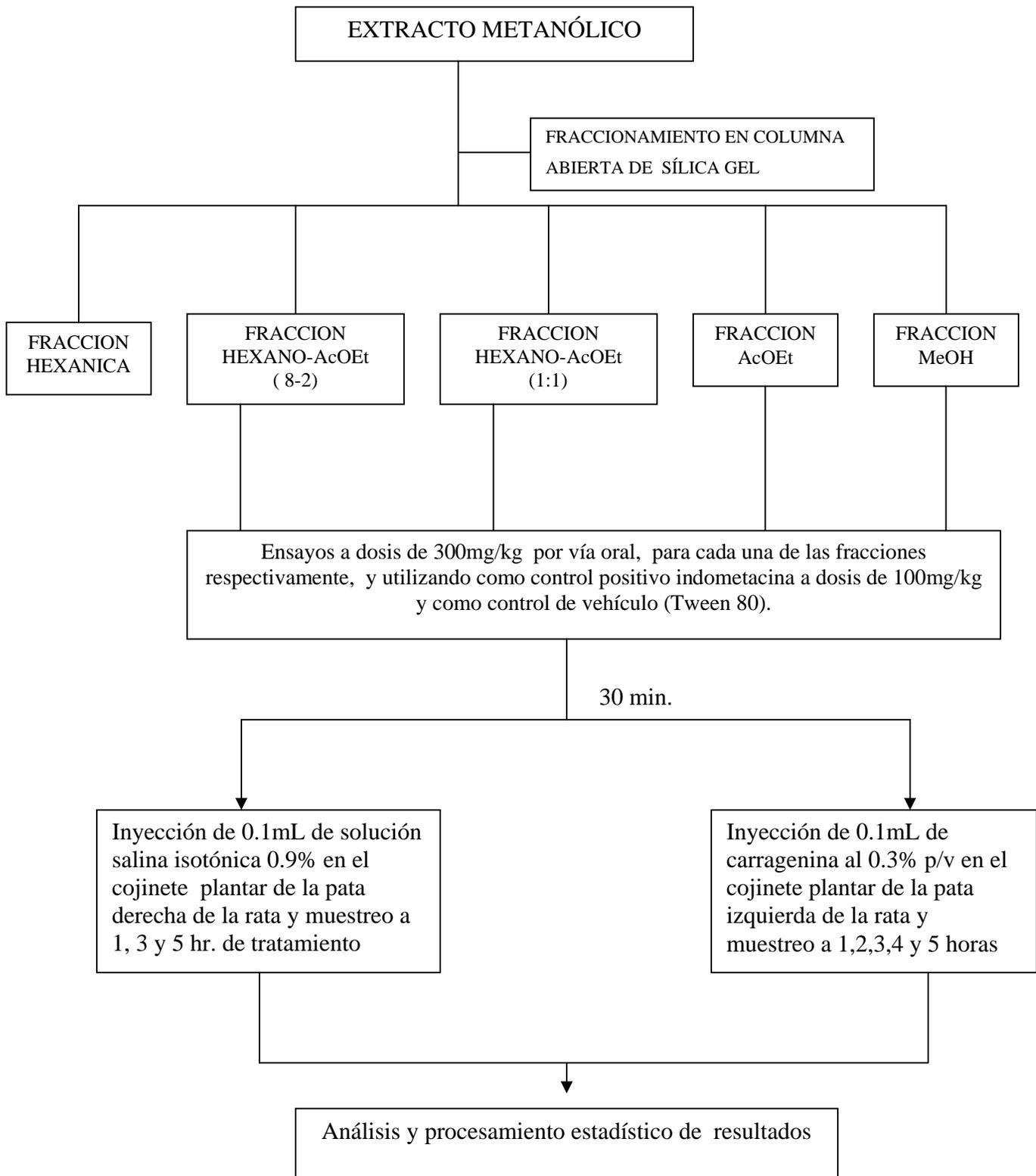
La fracción primaria metanólica (20.2g) fue subfraccionada en una columna cromatográfica de gel de sílice de vidrio utilizando el mismo procedimiento mencionado para el primer fraccionamiento y nuevamente con los sistemas de disolventes para elución a), b), c), d) y e). Las fracciones secundarias c), d), y e) fueron probadas en el bioensayo antiinflamatorio a la dosis de 100 mg/kg de peso. El control positivo (indometacina) fue aplicado a dosis de 100 mg/kg de peso de rata. En los Esquemas 3 y 4 se muestra la metodología empleada para el fraccionamiento cromatográfico.

4.5.- Análisis estadístico:

Los resultados fueron analizados estadísticamente con un análisis de varianza de un factor (ANOVA), como prueba paramétrica se aplica para variables continuas con una distribución normal, seguida por una comparación de medias por el metodo de Dunnett, considerando diferencias significativas para un $p < 0.05$. Lo anterior fue calculado apoyándose en el programa GraphPad Prism 4.



Esquema 3.-Esquema general de la metodología utilizada para determinar la actividad antiinflamatoria en extractos de la corteza de *A. acuminata ssp arguta* (Rovelo, 2002)



Esquema 4.-Esquema general de la metodología utilizada para determinar la actividad antiinflamatoria en fracciones del extracto MeOH de la corteza de *A. acuminata*



- 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN -

El material vegetal fue seleccionado para este estudio de acuerdo a un análisis bioprospectivo etnofarmacológico (Haddad, 2005) realizado previamente a esta planta en el estado de Chiapas (el cual dejó ver que la parte que se utiliza principalmente es la corteza), para lo cual, la corteza fue secada a temperatura ambiente y a la sombra; posteriormente se sometió al proceso de fragmentación para aumentar la superficie de ésta y permitir mejor interacción con el disolvente al momento de macerar. La planta se identificó botánicamente en forma previa. Posteriormente el material vegetal seco y molido, fue extraído mediante un proceso de maceración, cabe destacar que se utilizó maceración porque es una de las técnicas que se emplean en plantas que no han sido previamente estudiadas y evitar degradar posibles componentes termolábiles. Se utilizaron diferentes disolventes en orden de polaridad ascendente empezando con el menos polar es decir el n-hexano, para extraer los metabolitos secundarios no polares, posteriormente se extrajo con cloroformo para extraer todos aquellos compuestos que posean mediana polaridad, finalmente metanol para obtener todos los compuestos polares.

Los resultados obtenidos de las extracciones se muestran en la Tabla 4:

Disolvente	Corteza (2000g)
Hexano	24.451g
Cloroformo	13.866g
Metanol	29.33g

Tabla 4 : Extractos obtenidos de *Alnus acuminata*

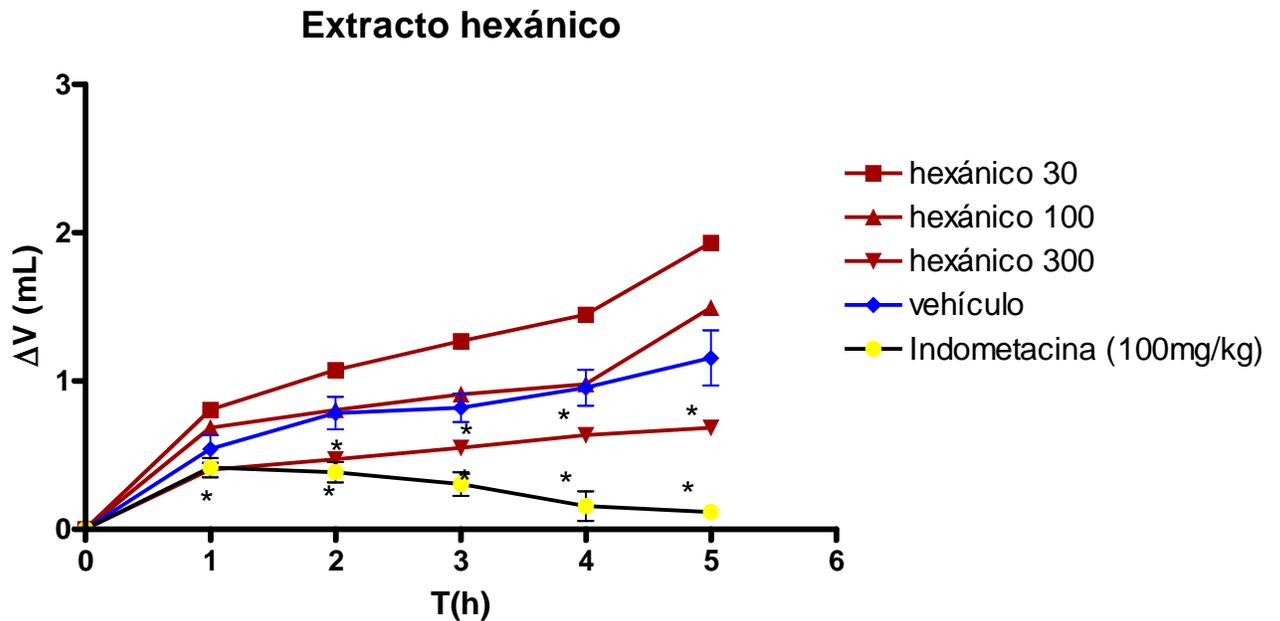


5.1.- Pruebas de actividad antiinflamatoria

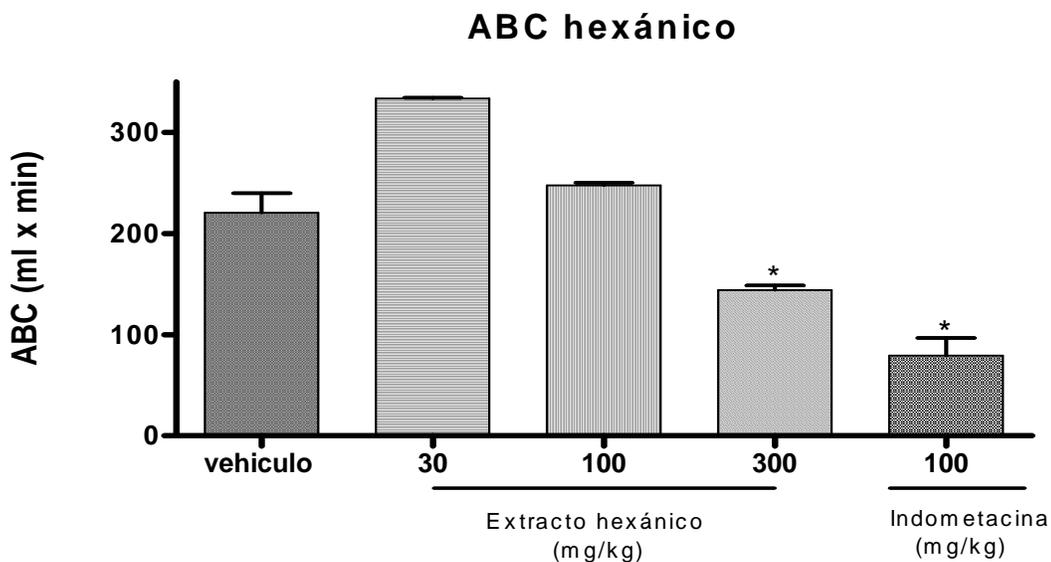
La actividad antiinflamatoria de los extractos y de las fracciones fue determinada mediante el modelo de edema en pata de rata inducida por carragenina, descrito en la literatura (Winter y Risley, 1962), utilizando la metodología descrita en Materiales y Métodos.

La variación del edema se cuantificó mediante la diferencia de las mediciones del volumen de la pata tratada con carragenina a los diferentes tiempos (V_t) con respecto al volumen obtenido antes del tratamiento (V_o), en cada uno de los animales (Salama, 2005). Los datos fueron manipulados para trazar gráficas de curso-temporal del efecto antiinflamatorio durante las 5 horas del ensayo y para el cálculo de áreas bajo la curva (ABC dada en mL x min).

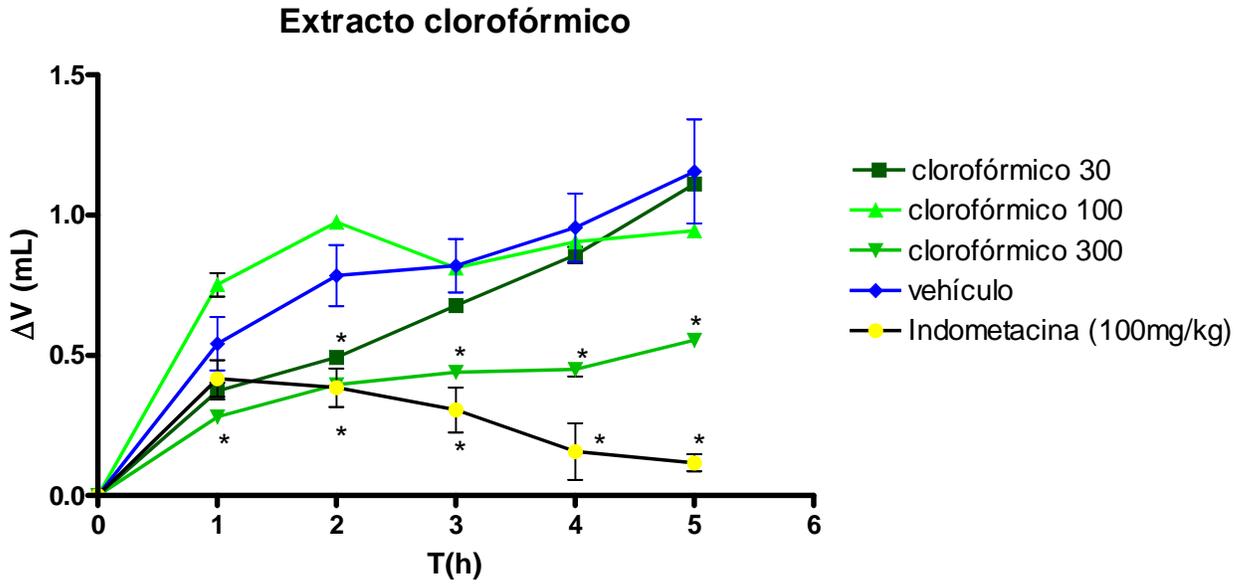
En la primera parte del experimento, se valoró la actividad antiinflamatoria de los extractos (hexánico, clorofórmico y metanólico) utilizando dosis de 30, 100 y 300 mg de extracto por kg de peso de animal; ésto debido a que en un trabajo anteriormente realizado (Rovelo, 2002), en el extracto metanólico de la corteza se encontró actividad a las dosis mencionadas. Para el caso del control positivo, es decir la indometacina, únicamente se trabajó con una dosis de 100 mg/kg debido a que se ha observado que esta dosis resulta ser efectiva en este tipo de pruebas (Winter y Risley, 1962). Posteriormente se trazaron las gráficas correspondientes a la evaluación antiinflamatoria de los extractos primarios obtenidos a partir de la corteza, las cuales se muestran en las Gráficas 1, 1-A, 2, 2-A, 3, 3-A y 4:



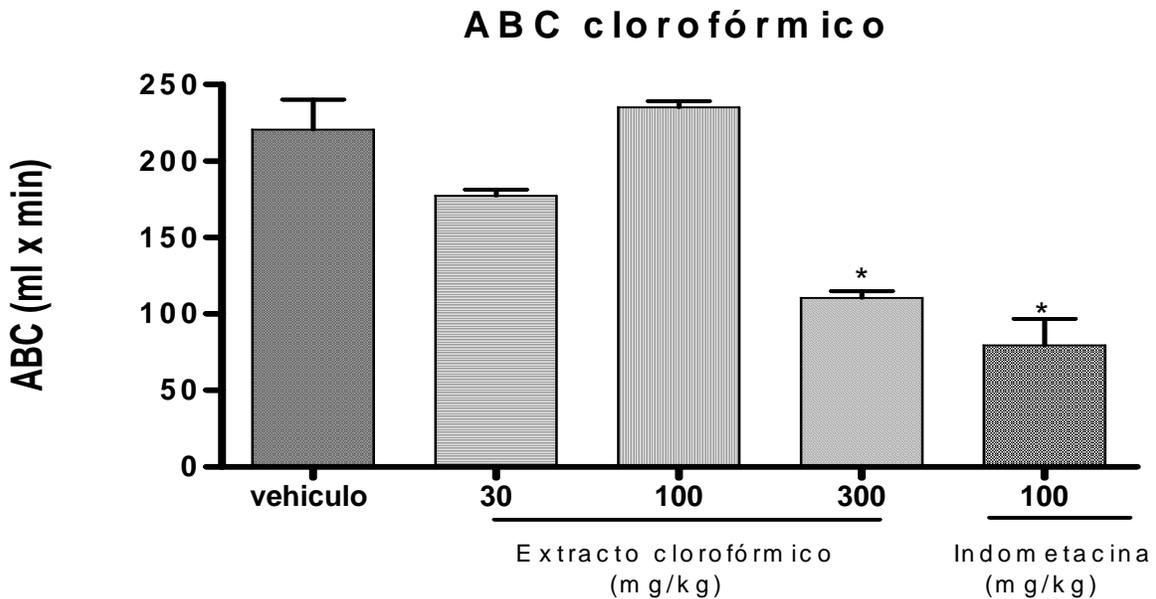
Gráfica 1.- Curva curso-temporal del efecto antiinflamatorio (ΔV) del extracto hexánico. El grupo control se señala como vehículo (Tween 80) y el grupo tratado con indometacina a 100mg/kg. Cada línea es la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control. Para las dosis de 30, 100 y 300 mg/kg el error estándar fue mínimo, por lo que no se alcanza a apreciar en la gráfica.



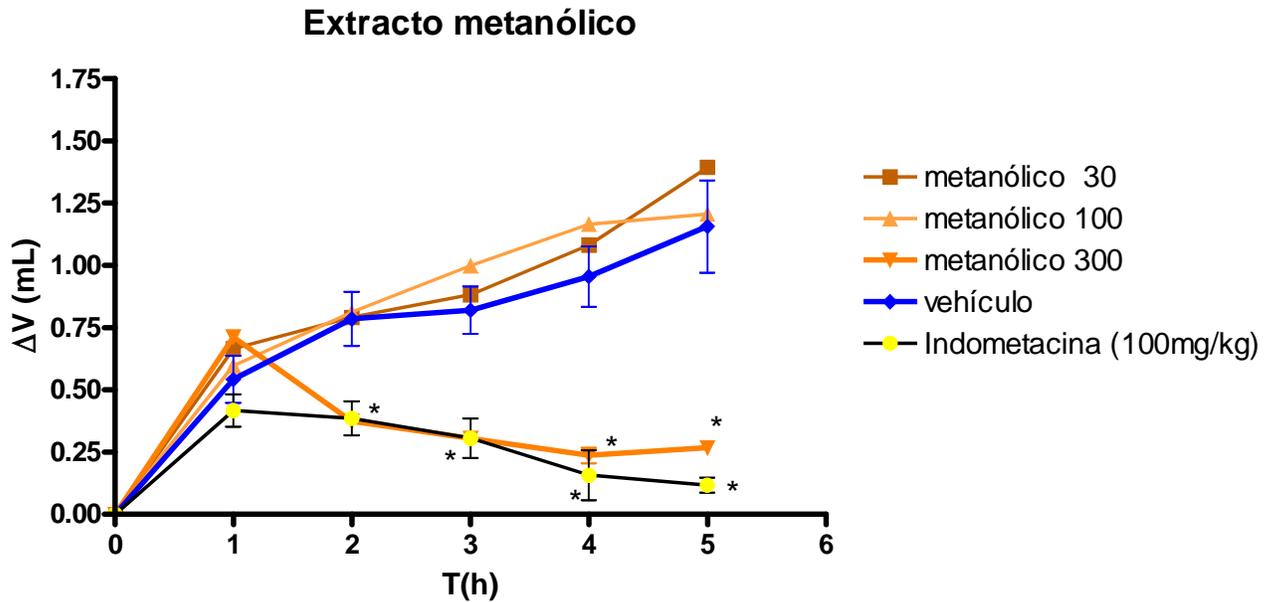
Gráfica 1-A.- Relación de Áreas Bajo la Curva (ABC en mL x min) de la gráfica 1 para las diferentes dosis del extracto hexánico. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.



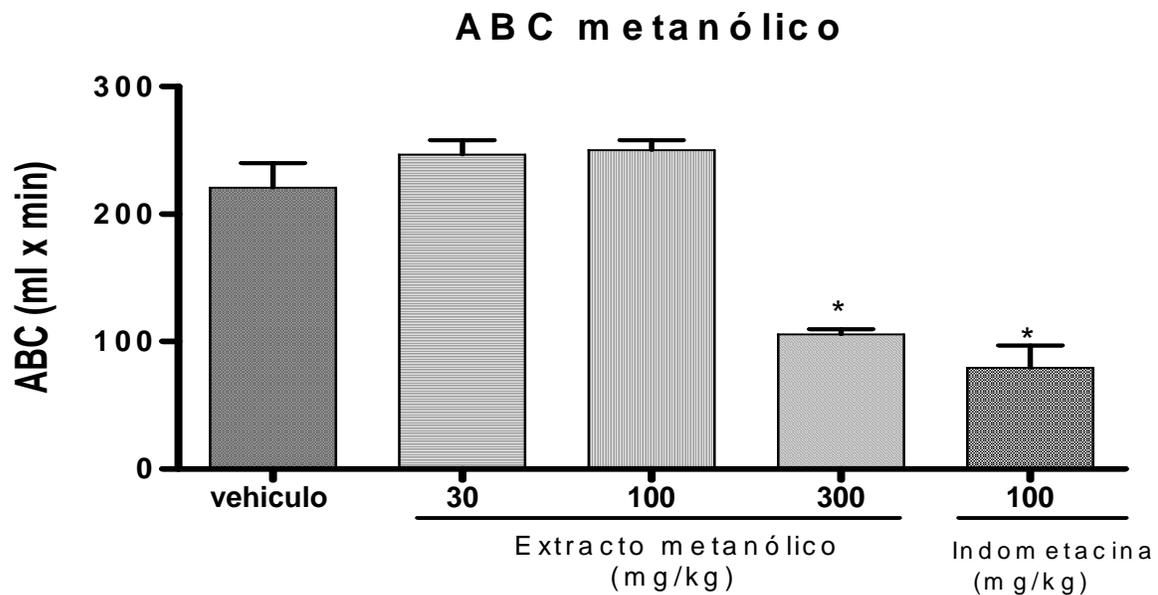
Gráfica 2: Curva curso-temporal del efecto antiinflamatorio (ΔV) del extracto clorofórmico. El grupo control (Tween 80) se señala como vehículo y el grupo tratado indometacina a 100mg/kg. Cada línea es la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control. Para las dosis de 100 y 300 mg/kg el error estándar fue mínimo, por lo que no se alcanza a apreciar en la gráfica



Gráfica 2-A: Relación de Áreas Bajo la Curva (ABC en mL x min) de la gráfica 2 para las diferentes dosis del extracto clorofórmico. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.



Gráfica 3: Curva curso-temporal del efecto antiinflamatorio (ΔV) del extracto metanólico, el grupo control (Tween 80) se señala como vehículo y el grupo tratado con indometacina a 100 mg/kg. Cada línea es la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.



Gráfica 3-A: Relación de Áreas Bajo la Curva (ABC en mL x min) de la gráfica 3 para las diferentes dosis del extracto metanólico. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.



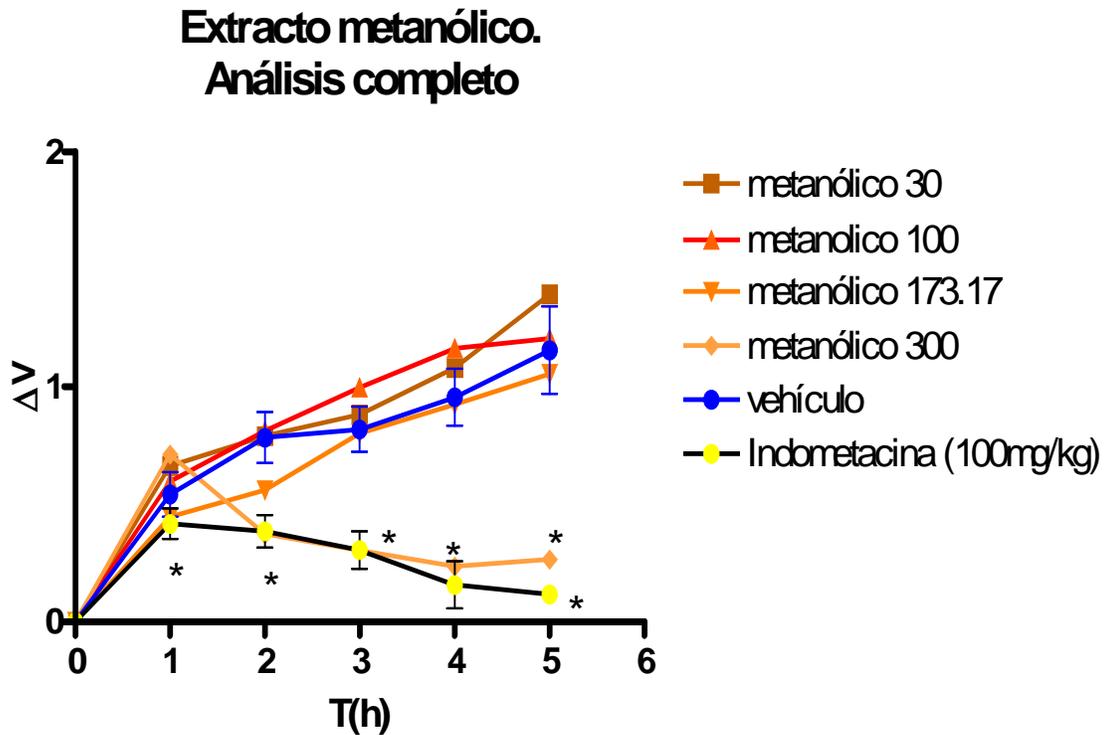
- En la Gráfica 1 (extracto hexánico) podemos observar una disminución de la inflamación en el caso de la dosis de 300 mg/kg, dentro de las 3 a las 5 hr de actividad. Esto se puede ver más claramente en la Gráfica 1-A correspondiente al ABC que nos da una idea del efecto antiinflamatorio completo en un periodo de 5 horas y que nos muestra dentro de las áreas correspondientes al extracto, la menor para esta dosis (300 mg/kg). En el caso de las dosis de 30 y 100 mg/kg, en la gráfica de curso temporal se observa menor disminución de la inflamación con respecto al tiempo y por lo tanto, mayores áreas bajo la curva, que en el caso de la dosis de 300 mg/kg, lo cual podría ser debido a que a estas dosis (30 y 100 mg/kg) se produzca determinada actividad pro-inflamatoria, lo cual podría ser debido a la presencia de algún metabolito en el extracto que hubiera producido actividad sinérgica con la carragenina, o en otro caso que esté ocurriendo un daño a las membranas mayor que el provocado por la carragenina, liberando los factores de la inflamación.

-En el caso del extracto clorofórmico cuyos resultados se muestran en las Gráficas 2 y 2-A, podemos apreciar una similitud con el extracto hexánico, ya que a las dosis de 30 y 100 mg/kg, se observa una posible actividad proinflamatoria lo cual, como ya se mencionó anteriormente ocurre de modo común en extractos de productos naturales en los cuales no se conoce su riqueza metabólica y que pudieran estar presentes compuestos que desaten diferentes respuestas inmunitarias y por lo tanto inflamatorias. Si analizamos el caso de la dosis mas alta (300 mg/kg), se observa una determinada disminución de la diferencia del volumen con respecto al tiempo y por lo tanto de la inflamación, con respecto del control, sobre todo de la tercera a la quinta hora del ensayo al igual que en el caso del extracto hexánico, también se puede apreciar en la Gráfica 2A, que en el caso de esta dosis, el ABC es la menor en referencia con las otras dos dosis.

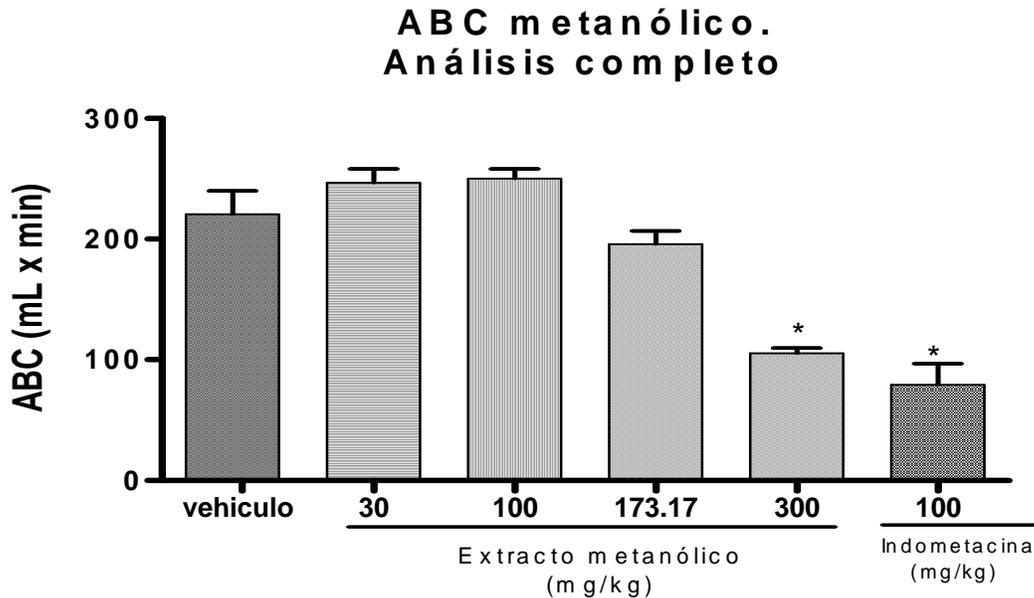
El extracto metanólico presentó una respuesta parecida a los extractos anteriores en las dosis respectivas (Gráficas 3 y 3-A), es decir se observa una determinada actividad pro-inflamatoria a las dosis de 30 y 100 mg/kg, y la dosis de 300 mg/kg mostró actividad plenamente positiva en cuanto a la diferencia del volumen con respecto al tiempo, sobre todo entre las 3 y las 5 horas, lo cual se puede apreciar también en la gráfica correspondiente al ABC donde se observa que el área correspondiente a esta dosis es la menor, e inclusive es comparable con la del control positivo. Por lo anterior, se probaron



dosis adicionales de 54.77 y 173.17 mg/kg que constituían la media entre las dosis iniciales, para permitir observar si existía una relación directa entre la dosis y el efecto. Sin embargo, en la dosis de 54.77mg/kg los datos de diferencias de volumen se observaron bastante dispares con el resto, por lo cual fueron omitidos en este estudio, a diferencia de la dosis de 173.17 mg/kg la cual si se tomó en cuenta e inclusive se graficó con este dato (Gráfica 3-B y 3-C).



Gráfica 3-B: Curva curso-temporal del efecto antiinflamatorio (ΔV) de extracto metanólico. El grupo control (Tween 80) se señala como vehículo y el tratado con indometacina s 100(mgKg). Cada línea es la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control

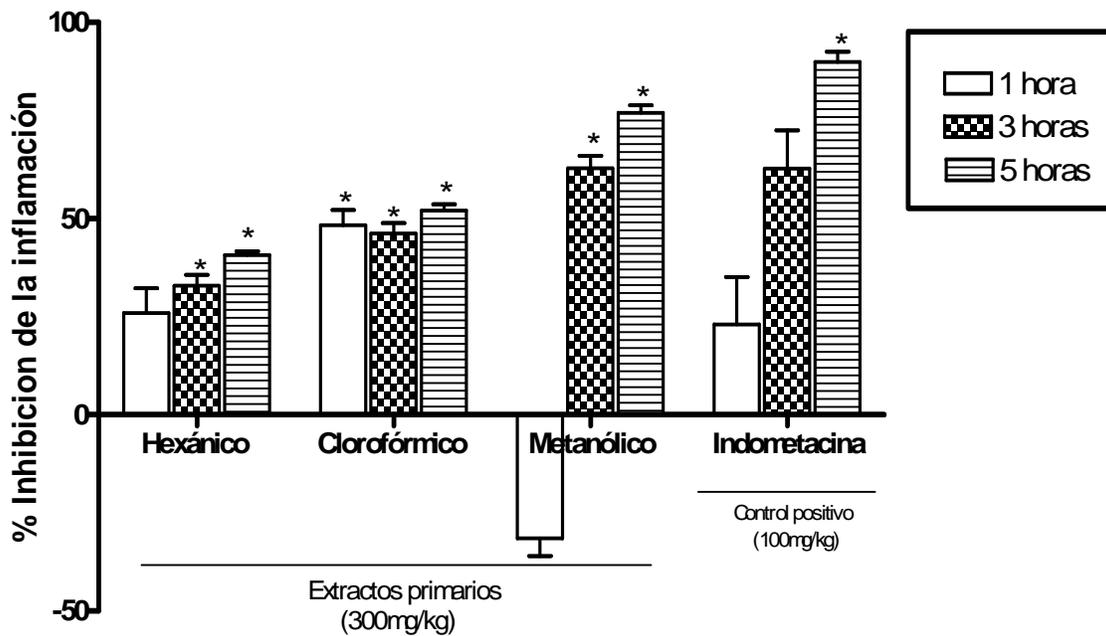


Gráfica 3-C: Relación de Área Bajo la Curva (ABC en mL x min) de la gráfica 3-B, para las diferentes dosis del extracto metanólico. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. *P< 0.05 con respecto al control.

Para cada gráfica representativa del curso-temporal, se calculó el porcentaje de inhibición (% I) de la siguiente manera (Rovelo, 2002):

$$\%I = \frac{\Delta V \text{ control} - \Delta V \text{ tratamiento}}{\Delta V \text{ de control}} \times 100$$

Para graficar los resultados de %I se tomaron en consideración únicamente los datos obtenidos a las 1, 3 y 5 horas (Salama, 2005), ya que esto no solo representa exactamente el comportamiento de los extractos, sino que además entre las 3 y las 5 horas posteriores a la administración de la carragenina se alcanza el efecto máximo de ésta y por lo tanto, se obtiene el mayor efecto antiinflamatorio en los tratamientos respectivos. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido de una prueba confirmatoria de Dunnett, para demostrar que la variación fue debida al tratamiento, considerando diferencias significativas para un $p < 0.05$ (Tallarida, 1981). Para cada gráfica se muestran los datos de porcentos de inhibición respectivos, para hacer una comparación respectiva de los resultados de cada uno de ellos a las 1, 3 y 5 horas.



Gráfica 4: Actividad antiinflamatoria de los extractos metanólicos, clorofórmico, hexánico e indometacina. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ respecto al control.

Tiempo \ Tratamiento	Control positivo Indometacina 100mg/Kg	Extractos primarios de corteza		
		Hexánico 300mg/Kg	Clorofórmico 300mg/Kg	Metanólico 300mg/Kg
1 hora	23.0 \pm 2.6	25.9 \pm 15.4	48.3 \pm 9.7	-31.5 \pm 11.0
3 horas	62.7 \pm 2.9	32.8 \pm 6.2	46.2 \pm 6.5	62.9 \pm 7.8
5 horas	89.9 \pm 6.4	40.7 \pm 2.4	52.0 \pm 3.8	76.9 \pm 4.7

Tabla 5: Actividad antiinflamatoria de extractos primarios de corteza. Cada porcentaje de inhibición es presentado con su respectiva desviación estándar.

Cabe destacar que con respecto a los resultados del cálculo del porcentaje de inhibición, correspondientes a los extractos, en la Tabla 5 se presentan únicamente los datos para la dosis de 300 mg/kg.



En los resultados de la Gráfica 4 y de la Tabla 5 se muestra una actividad antiinflamatoria que aumenta entre las 3 y las 5 horas de actividad, para los casos de los extractos metanólico: $-31.5 \pm 11.0\%$ en la primera hora hasta $76.9 \pm 4.7\%$ en la última hora, hexánico: $25.9 \pm 15.4\%$ en la primera hora y $40.7 \pm 2.4\%$ en la última hora e indometacina: $23.0 \pm 2.6\%$ en la primera hora y $89.9 \pm 6.4\%$ en la última hora.

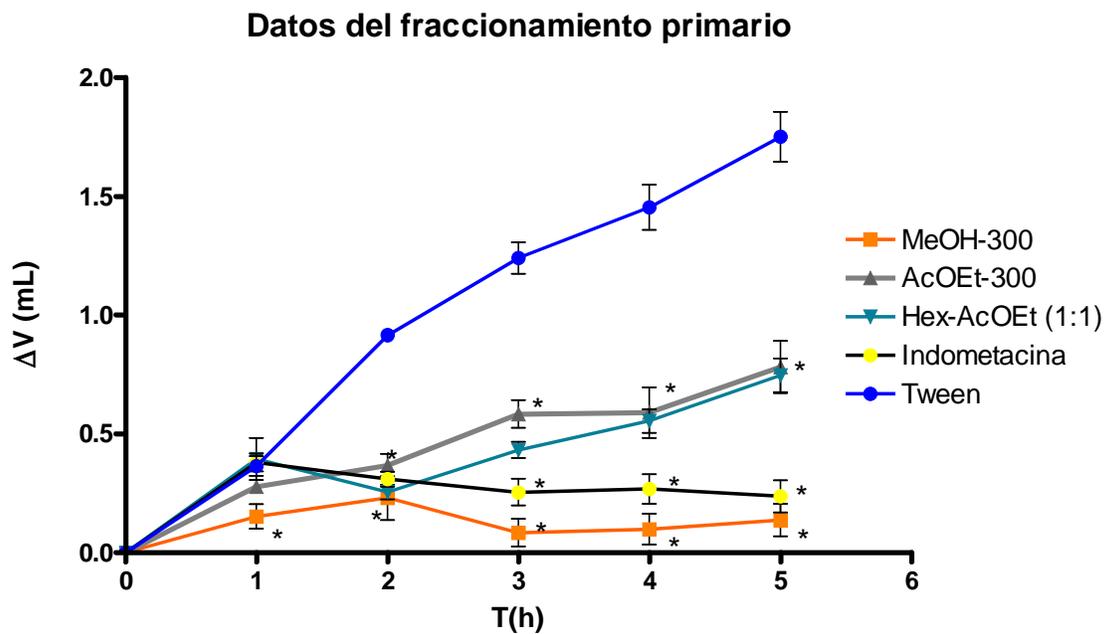
Como se puede observar, el efecto comparado entre la indometacina y el extr. metanólico es semejante ya que en ambos tratamientos existe una determinada relación efecto-tiempo, donde se evidencia un aumento del porcentaje de inhibición de la inflamación desde la primera hasta la quinta hora. Informes de la literatura (Salama, 2005) mencionan que existen algunos compuesto de características polares que presentan actividad sobre la inflamación. En nuestro caso, compuestos con estas características (polares) pudieran estar presentes en este extracto (Illescas, 2007), por lo cual, se retardaría su absorción y por ende el resultado de su efecto se presenta entre las tres y las cinco horas de actividad para ambos tratamientos, tiempo en el cual la carragenina ejerce su mayor efecto.

En el caso del extracto clorofórmico, se observa una determinada actividad antiinflamatoria constante desde la primera hora ($48.3 \pm 9.7\%$), hasta la quinta hora ($52.0 \pm 3.8\%$) y no es muy representativa, al igual que la actividad del extracto hexánico, lo cual es debido probablemente a que durante el proceso de maceración, algunos de los compuestos polares activos permanezcan en este extracto.

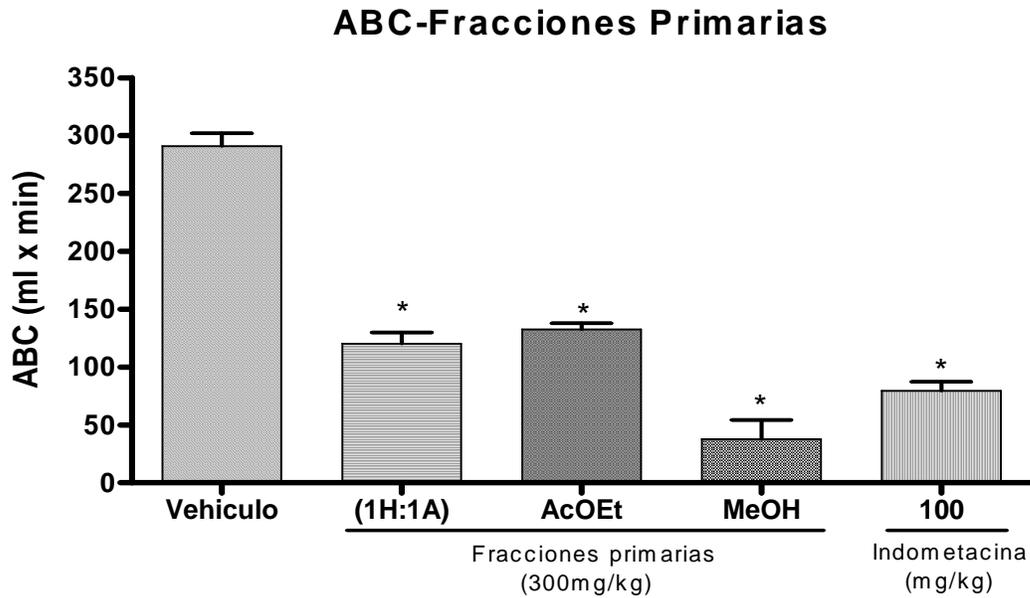
El extracto metanólico fue el que mayor actividad antiinflamatoria presentó entre las 3 y las 5 horas del bioensayo ($62.9 \pm 7.8\%$ a la tercer hora y $76.9 \pm 4.7\%$ a la quinta hora) con respecto al control positivo (Indometacina, 89.9 ± 6.4) [Gráficas 3, 3-A, 3-B, 3-C y 4] y fue por lo tanto el más importante para nuestro estudio; éste se fraccionó en una columna cromatográfica de la siguiente manera: 50 g del extracto se preadsorbieron en 50g de gel de sílice y se montaron en una columna preparativa de gel de sílice abierta, para intentar separar los componentes no polares que pudieran interferir en la separación de los metabolitos más polares, probables responsables de la actividad biológica. Únicamente las fracciones primarias c), d), y e) [c) hexano-acetato de etilo 50-50%, d) acetato de etilo 100% y e) metanol] fueron ensayadas en el modelo de actividad antiinflamatoria antes



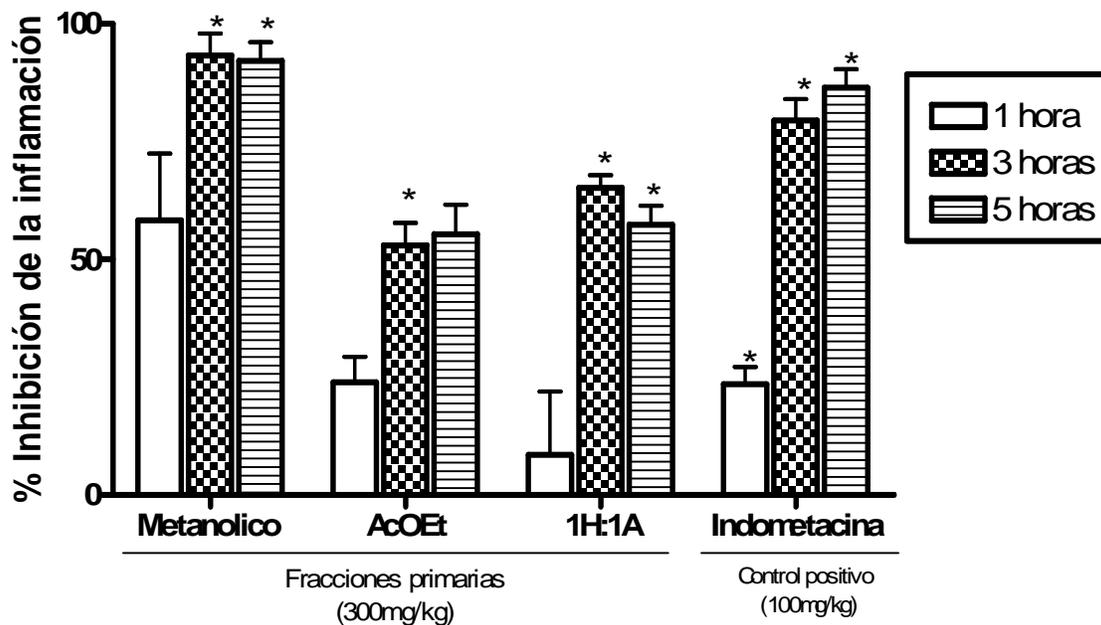
mencionado (ya que se pretendía discriminar y aislar de esta manera el (o los) metabolito (s) secundario (s) activo (s) del extracto más activo) probadas a dosis de 300mg/kg de peso, de nueva cuenta en lotes de 8 ratas, empleando como control positivo la indometacina (100mg/kg) y como control negativo al Tween 80; posteriormente los resultados fueron manipulados como se describe en Materiales y Métodos.



Gráfica 5: Curva curso-temporal del efecto antiinflamatorio de las fracciones primarias del extracto metanólico. Cada línea es la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.



Gráfica 5-A: Relación de áreas bajo la curva (ABC) de la gráfica 5. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control. (1H:1A): medio de elución con hexano-AcOEt 1:1.



Gráfica 6: Actividad antiinflamatoria de las fracciones primarias obtenidas a partir del extracto metanólico. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ respecto al control. (1H:1A): medio de elución con hexano-AcOEt 1:1.



Tratamiento Tiempo	Control positivo Indometacina 100mg/Kg	Fraccionamiento primario del extracto Metanólico		
		Hexano:AcOEt (1:1) 300mg/Kg	AcOEt 300mg/Kg	MeOH 300mg/Kg
1 hora	23.5 ± 9.0	8.5 ± 3.2	23.9 ± 13.4	58.3 ± 4.7
3 horas	79.5 ± 11.0	65.1 ± 6.6	52.9 ± 11.6	93.3 ± 11.4
5 horas	86.5 ± 9.4	57.4 ± 9.9	55.4 ± 15.3	92.2 ± 9.5

Tabla 6: Actividad antiinflamatoria de las fracciones primarias obtenidas a partir del extracto metanólico.

Cada dato de por ciento de inhibición es presentado con su respectiva desviación estándar.

Como se puede observar en la Gráfica 5 de curso-temporal del efecto antiinflamatorio correspondiente a las fracciones derivadas del extracto metanólico, podemos apreciar un efecto adecuado para el caso del vehículo pues no interfiere, por otro lado el control respectivo para la indometacina presenta la actividad antiinflamatoria esperada (Rovelo, 2002).

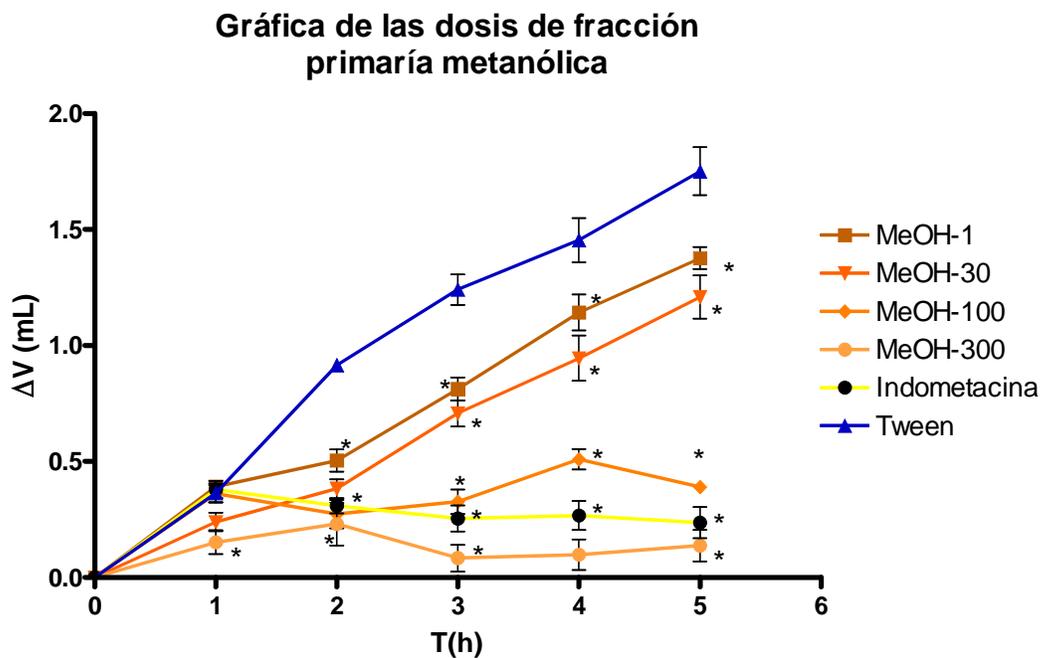
En lo que respecta a las fracciones probadas, la fracción metanólica presentó el mayor efecto antiinflamatorio ya que en la primera hora presentó un por ciento de inhibición de 58.3 ± 4.7 %, lo cual es prometedor pues ésta podría ser utilizada para el tratamiento de casos de inflamación aguda. Por otro lado, el mayor efecto antiinflamatorio lo presenta a la tercera hora con un por ciento de inhibición de 93.3 ± 11.4 %, mismo que se mantiene en la quinta hora (92.2 ± 9.5 %), además se puede confirmar una actividad semejante a la provocada por el tratamiento con el control positivo pues además, esta fracción contiene un área bajo la curva menor que la del control (Indometacina 100mg/kg). Aunque aparentemente a simple vista no existe punto de comparación entre la actividad de la indometacina y la fracción metanólica, pues la indometacina está dosificada a 100 mg/kg mientras que las fracciones a 300mg/kg, hay que argumentar que éstas consisten de mezclas de muchos otros compuestos que probablemente no presentan actividad, mientras que la indometacina esta relativamente pura.

Por lo que respecta a las fracciones de hexano–AcOEt (1:1), y de AcOEt (Tabla 6), presentaron un porcentaje de inhibición de 57.4 ± 9.9 % y 55.4 ± 15.3 % respectivamente a

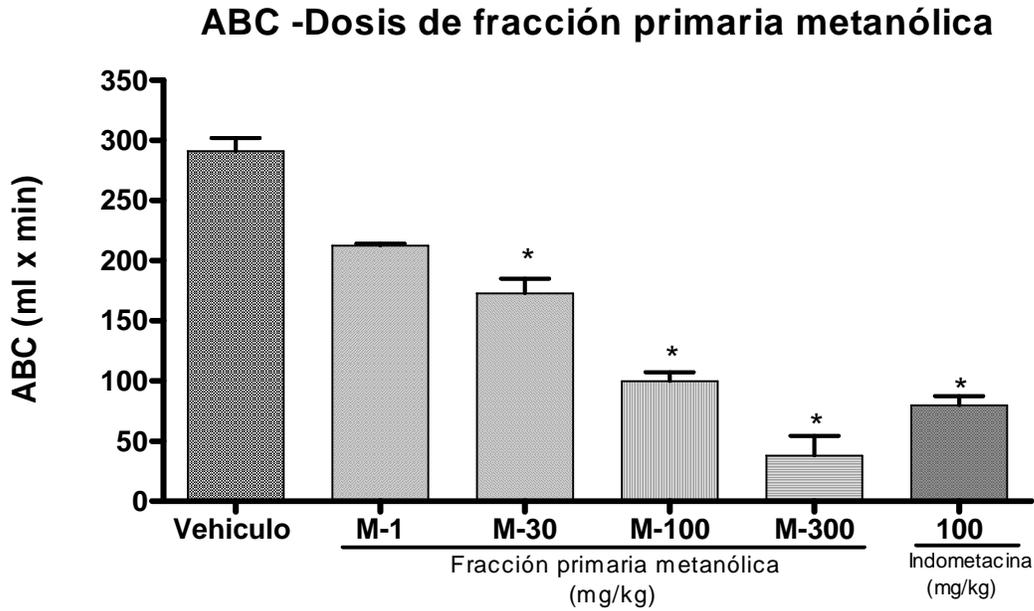


la quinta hora, sin embargo aunque es interesante que se haya alcanzado un porcentaje de inhibición mayor al 50%, el dato no es representativo ya que como se mencionó anteriormente la fracción primaria metanólica refleja no solo un área bajo la curva mucho menor a la del control positivo (indometacina) y a las dos fracciones antes mencionadas (Gráfico 5-A), sino que además presenta un porcentaje de inhibición mayor, por lo cual podemos discernir que el o los metabolitos responsables de la actividad se encuentran en mayor concentración en esta fracción primaria (Illescas, 2007), lo cual nos motivó a probar dosis menores a la de 300mg/kg no sólo para confirmar la actividad sino que además intentar encontrar si existe una determinada relación directa entre la dosis y el efecto.

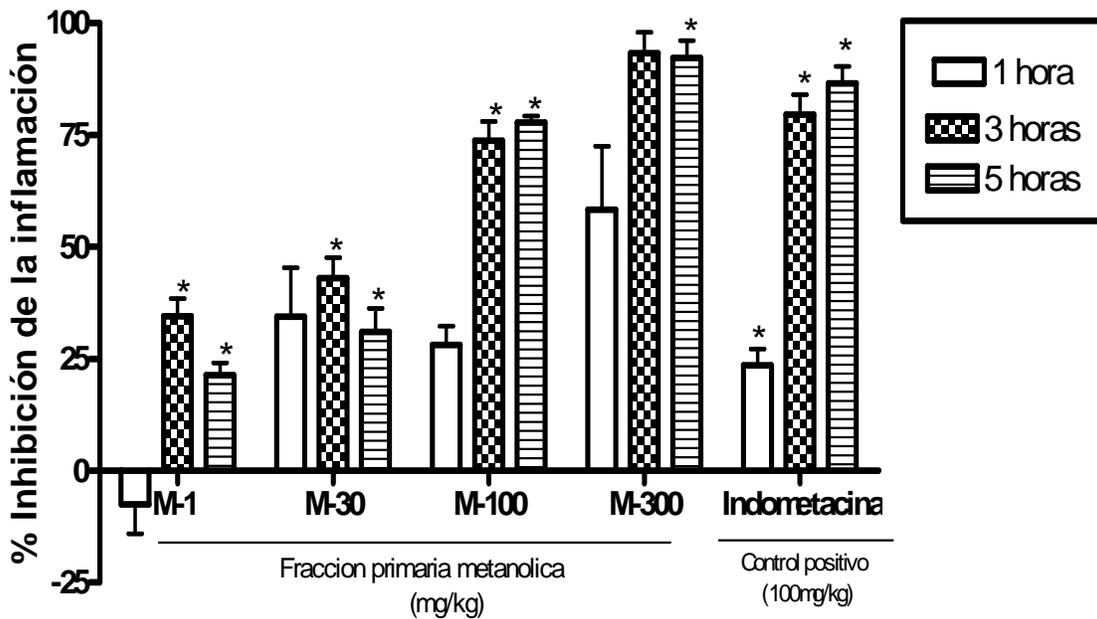
Por lo antes mencionado, se probaron las dosis de 1, 30 y 100 mg/kg (esta última para además intentar comparar directamente su resultado con el control positivo (indometacina) pues es la misma dosis a la cual éste se emplea). Cabe destacar que como se indicó en la justificación, si se intentara elaborar un fitomedicamento, se propondría a esta fracción como activo, ya que tiene un porcentaje de inhibición bastante interesante. Los resultados fueron procesados como se describió anteriormente.



Gráfica 7: Curva curso-temporal del efecto antiinflamatorio de las diferentes dosis probadas de la fracción metanólica. Cada línea es la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.



Gráfica 7-A: Relación de áreas bajo la curva (ABC) de la gráfica 7; se señalan las dosis empleadas como M-1 (1mg/kg); M-30 (30mg/kg); M-100 (100mg/kg); M-300 (300mg/kg); Vehículo (Tween 80); e Indometacin (100mg/kg). Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.



Gráfica 8: Actividad antiinflamatoria de las diferentes dosis trabajadas de fracciones primarias metanólicas. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ respecto al control.



Tratamiento Tiempo	Control positivo Indometacina 100mg/Kg	Fracciones primarias metanólicas			
		M-1 1mg/kg	M-30 30 mg/kg	M-100 100mg/kg	M-300 300mg/kg
1 hora	-4.0 ± 2.4	-7.6 ± 15.9	34.4 ± 16.9	28.1 ± 10.2	58.3 ± 17
3 horas	79.5 ± 11.0	34.5 ± 9.6	42.9 ± 11.2	73.7 ± 10.5	93.3 ± 11.4
5 horas	86.5 ± 9.4	21.4 ± 6.6	30.9±12.9	77.8 ± 3.5	92.2 ± 9.5

Tabla 7: Actividad antiinflamatoria de las diferentes dosis trabajadas para las fracciones primarias metanólicas. Cada dato de porciento de inhibición es presentado con su respectiva desviación estándar.

Al probarse la fracción metanólica en las dosis de 100, 30 y 1 mg/kg se pudo observar que existía una relación directa entre la dosis, el efecto y el efecto-tiempo, ya que el efecto antiinflamatorio se aumenta alrededor de la dosis de 100mg/kg y se eleva hasta la máxima dosis ensayada de 300mg/kg, además de que aumenta con el tiempo, como lo confirman los resultados: $73.7 \pm 10.5\%$ y $77.8 \pm 3.5\%$ para las 3 y 5 horas para la dosis de 100mg/Kg de la fracción metanólica y de $93.3 \pm 11.4\%$ y 92.2 ± 9.5 para las 3 y las 5 horas de la dosis de 300mg/kg de la misma fracción.

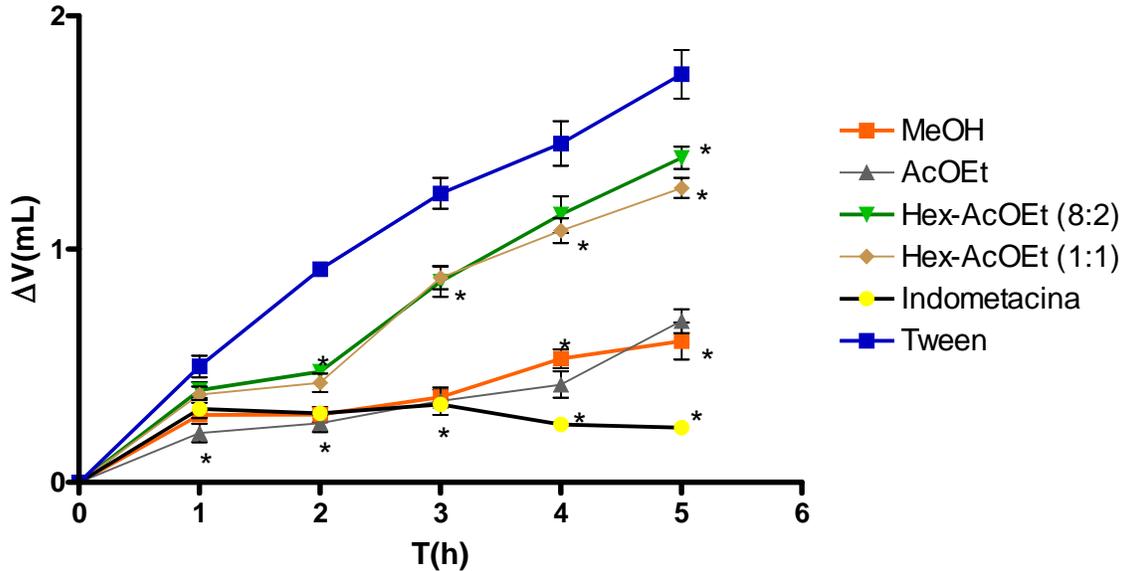
Después de analizar la fracción metanólica por cromatografía de capa fina se observó que ésta era de composición metabólica compleja, por lo que fue subfraccionada, posteriormente para tratar de aislar y purificar los metabolitos secundarios contenidos en la misma (Illescas, 2007).

Así, la fracción primaria metanólica (20.2g) fue subfraccionada en una columna cromatográfica de gel de sílice de vidrio utilizando el mismo procedimiento mencionado para el primer fraccionamiento y nuevamente los sistemas de disolventes para elución fueron: a) hexano 100%, b) hexano-acetato de etilo 80-20%, c) hexano-acetato de etilo 50-50%, d) acetato de etilo 100% y e) metanol, para saber en que subfracción se podría encontrar el o los metabolitos responsables de la actividad. Las fracciones secundarias c), d) y e) fueron probadas en el bioensayo antiinflamatorio solamente a la dosis de 100mg/kg de peso, debido a que ya se encuentra más pura esta subfracción. El control positivo fue



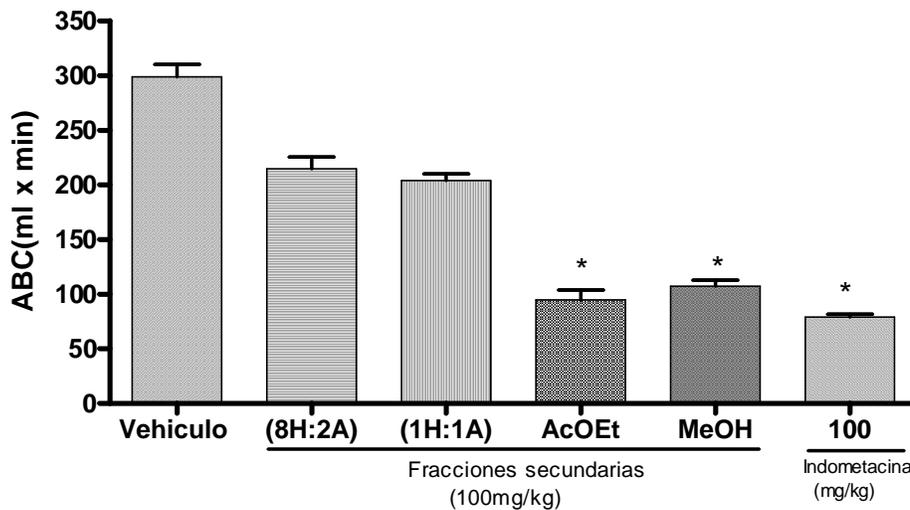
aplicado a la dosis de 100 mg/kg de peso al igual que en los bioensayos anteriores. Los resultados se esquematizan en las Gráficas 9, 9-A y 10.

Gráfica de la fracción secundaria metanólica

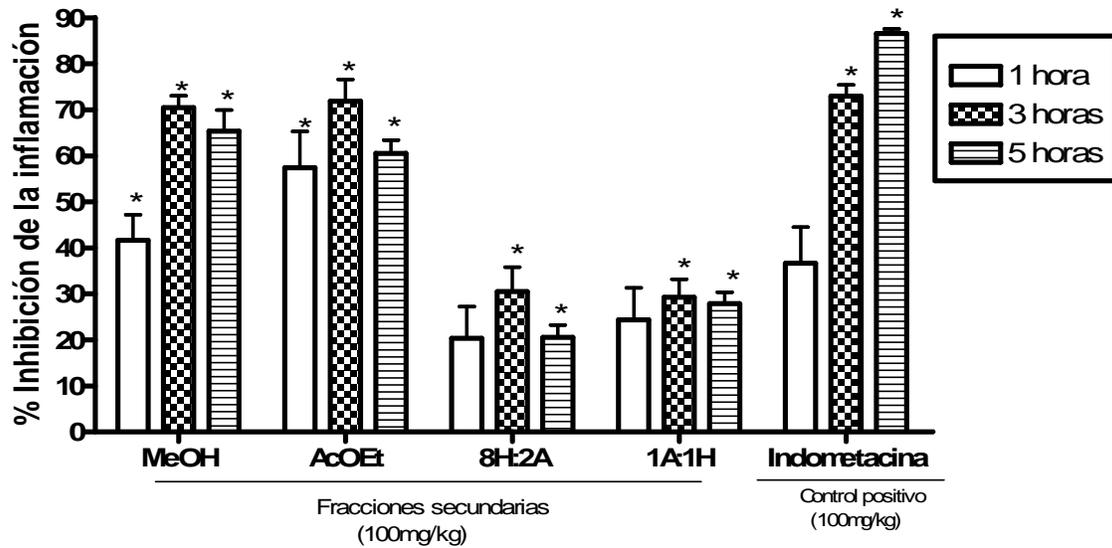


Gráfica 9: Curva curso-temporal del efecto antiinflamatorio de las fracciones secundarias del extracto metanólico. Cada línea es la media \pm EEM de 6 animales * $P < 0.05$ con respecto al control.

ABC- de las fracciones secundarias metanólicas



Gráfica 9-A: Relación de áreas bajo la curva (ABC) de la gráfica 9. (8:2) hexano-AcOEt, (1:1) hexano-AcOEt; AcOEt; MeOH e Indometacina dosis de 100mg/kg. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.



Gráfica 10: Actividad antiinflamatoria de las fracciones secundarias probadas. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. *P<0.05 respecto al control. (1A:1H) es medio con 50% Hexano -50% AcOEt, (8H:2A) es medio con 80% Hexano: 20% AcOEt.

Tratamiento	Control positivo Indometacina 100mg/Kg	Fraccionamiento secundario			
		Hexano:AcOEt (8:2) 100mg/Kg	Hexano:AcOEt (1:1) 100mg/Kg	AcOEt 100mg/Kg	MeOH 100mg/Kg
Tiempo					
1 hora	36.6 \pm 19.1	20.3 \pm 16.9	24.4 \pm 17.0	57.4 \pm 19.3	41.6 \pm 13.5
3 horas	72.9 \pm 5.9	30.5 \pm 12.9	29.2 \pm 9.5	71.9 \pm 11.6	70.5 \pm 6.3
5 horas	86.6 \pm 2.4	20.5 \pm 6.1	27.9 \pm 6.1	60.5 \pm 7.2	65.4 \pm 11.1

Tabla 8. Actividad antiinflamatoria de las diferentes fracciones secundarias probadas. Cada dato de porcentaje de inhibición es presentado con su respectiva desviación estándar.



Como se puede observar en el Gráfico 10 y la Tabla 8 se puede apreciar también cierta actividad antiinflamatoria en todas las fracciones secundarias metanólicas, presentando para cada una un porcentaje de inhibición para la fracción (8:2) hexano-AcOEt, $30.5 \pm 12.9\%$ y $20.5 \pm 6.1\%$ a la tercera y quinta hora de la inducción de la inflamación; $29.2 \pm 9.5\%$ y $27.9 \pm 6.1\%$ para la fracción (1:1) hexano-AcOEt, $71.9 \pm 11.6\%$ y $60.5 \pm 7.2\%$ para AcOEt 100% a la tercera y quinta hora de la inducción de la inflamación y finalmente un $70.5 \pm 6.3\%$ y $65.4 \pm 11.1\%$ para MeOH a la tercera y quinta hora de inducción de la inflamación.

Al observar las gráficas 9 y 9-A referentes a curso temporal y área bajo la curva, podemos apreciar que para las fracciones secundarias de AcOEt y de MeOH se encuentra la mayor actividad antiinflamatoria y que inclusive el área bajo la curva de AcOEt es mas pequeña que la de MeOH, principalmente porque a la cuarta hora, ésta presenta el máximo de actividad antiinflamatoria por lo cual podemos decir que en estas dos fracciones secundarias se encontrará el o los metabolitos responsables de la actividad antiinflamatoria y que se pudo haber perdido o dividido parte de los metabolitos responsables de la actividad durante el fraccionamiento secundario pues el porcentaje de inhibición es menor que en el caso del fraccionamiento primario donde fue de $92.2 \pm 9.5\%$. Motivo por el cual ya no se siguió con el fraccionamiento pues al ser biodirigido se encontró la mayor actividad en la fracción metanólica y de ésta ya se podía intentar aislar e identificar algún compuesto activo.

Finalmente cabe destacar que en estudios previos (Pettipher, 1992) se ha demostrado que existen niveles elevados de los productos de la ciclooxigenasa, como la PGE₂ en el edema inducido por carragenina, por lo cual podemos inferir que probablemente la actividad antiinflamatoria de estos extractos y fracciones deba su efecto a una inhibición de la enzima ciclooxigenasa, que interviene en la síntesis de prostaglandinas en el metabolismo del ácido araquidónico. Esto además se apoya en el hecho de que existen antecedentes en otras especies de *Alnus* como por ejemplo en *A. hirsuta* var *sibirica* de la que se aislaron diversos compuestos derivados de la corteza como potentes antiinflamatorios por inhibición de ciclooxigenasa-2 (Min-Won *et al*, 2000). Por otra parte el extracto metanólico de la corteza de *A. japonica*, ha presentado en estudios previos una potente actividad antioxidante y como sabemos las especies oxidantes son precursoras de la inflamación



(Kuroyanagi *et al.* 2005). Por lo anterior y sin dejar a un lado el aspecto genético (que puede variar altamente de una especie a otra, inclusive en la misma región geográfica [Murillo, 2000]), puede inferirse que como en nuestro caso el extracto metanólico de corteza presentó el mayor índice de inhibición del edema, no es de sorprender que puedan llegar a aislarse de la misma, compuestos semejantes (diarilheptanoides o triterpenoides) a los encontrados en los estudios antes mencionados, que puedan inhibir alguna enzima del metabolismo del ácido araquidónico o que presenten algún efecto sobre especies oxidantes, para mostrar su actividad antiinflamatoria.



6.-CONCLUSIONES:

- 1) En el estudio antiinflamatorio de la corteza de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*, se encontró actividad antiinflamatoria *in vivo* en los extractos metanólico, hexánico y clorofórmico demostrándose una actividad menor de estos últimos dos con respecto del extracto metanólico.
- 2) El modelo biológico de elección para el ensayo de actividad antiinflamatoria resultó adecuado para el propósito de este trabajo debido a que fue posible seguir el estudio biodirigido para los extractos y las fracciones, además de poderse proponer una vía de acción.
- 3) De acuerdo con lo descrito en la literatura (Pettipher, 1992) en relación a la actividad antiinflamatoria en el modelo biológico empleado, los resultados obtenidos permiten inferir que el modo de acción de los extractos evaluados tiene una determinada relación con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.
- 4) Se obtuvieron las fracciones cromatográficas a partir del extracto de mayor actividad y tanto la fracción primaria como la secundaria metanólicas, conservaron la mayor actividad antiinflamatoria, sugiriendo que probablemente la actividad antiinflamatoria proveniente de los extractos de esta planta radica principalmente en metabolitos de alta polaridad.
- 5) La fracción primaria metanólica fue la que tuvo mayor actividad antiinflamatoria presentando un porcentaje de inhibición de 92.15%.
- 6) Se confirmaron los resultados previamente encontrados por Rovelo (2002), sobre la existencia de actividad antiinflamatoria proveniente del extracto de mayor polaridad de la corteza y por otra parte, se probaron los extractos de mediana y baja polaridad en el mismo modelo, y se fraccionó el extracto de mayor actividad.



7.- PERSPECTIVA

-Realizar el estudio antiinflamatorio *in vitro* para correlacionarlo con los resultados *in vivo*.

-Integrar la monografía correspondiente con los datos que hasta este momento se tiene (pruebas de identidad, pureza, composición, y actividad biológica) de esta planta.

-Realizar un estudio de desarrollo farmacéutico, para la formulación de un fitomedicamento tomando como principio activo la fracción primaria metanólica de la cual ya se conoce la dosis que tiene el mayor porcentaje de actividad, además de que no representaría un problema de solubilidad, por la polaridad de la misma.

- Los resultados de la actividad biológica se espera se puedan complementar con los estudios fotoquímicos (Illescas, 2007) realizados en la misma para encontrar finalmente el o los metabolitos responsables de la actividad.



8.- BIBLIOGRAFIA

- Angiosperms Phylogeny Group pagina web:
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/Apweb/welcome.html>

- Anónimo pagina web:
http://www.geocities.com/universitarios_ar/principal.html

- Chen J., Gonzales-Loredo R., Karchesy J. J. (2000). Minor Diarylheptanoid Glycosides of *Alnus rubra* Bark, *Phytochemistry*, **53**, 971-973.

- Clark W.G. , Johnson A. (1997); Farmacología Medica. 13a Edición , Editorial Mosby, España, 156-158

- Dermeci, B., Can-Baser H. (2000). Betulenols from Betula Species, *Planta Medica*, **66**, 490-493.

- Duke A.J. (2000). HandBook of Medical Herbs, CRC Press Inc. Boca Ratón Florida, USA, 145-148

- Evans T. (1985). Farmacognosia, Editorial Interamericana-McGraw-Hill, Barcelona España, 179-180.

- Fontquer (1962) Plantas Medicinales, Editorial Labor. Barcelona. pp. 97.

- Galgon T., Höke D. y Dräger B. (1999). Identification and Quantification of Betulinic Acid, *Phytochemical Analysis*, **10**, 187-190.

- Goldsby R.A., Thomas J.K., Osborne B.A., Kuby J. (2004). Inmunologia. Mc Graw Hill 5a Edicion pp. 7-9, 357-364.



- Gonzalez-Laredo R. F., Helm R. F., Chen J., Karchesy J. J., (1998). *Journal of Natural Products*, **61**, 1292-1294

- Haddad P.S., Georges A.A., Groom S., and Bovin M. (2005) Natural Health Products Modulation of Immune Function and Prevention of Chronic Diseases. *eCAM*. 2, 513-520

- Hanawa F. Shiro M., Yoshioki H. (1997). Heartwood Constituents of *Betula maximowicziana*. *Phytochemistry*, **45** (3), 589-595.

- Harbone B. (1985). *Dictionary of Organic Compounds*. 5th Edition, Marcel Dekker, New York, 276-320

- Huguet A., Recio M., Mães S., Giner R., Ríos J. (2000). Effect of Triterpenoids on the inflammation induced by protein Kinase C activators, Neuronally Acting Irritants and Other agents, *European Journal of Pharmacology*, **410**, 69-81.

- Illescas-Pomposo, O. (2007). "Análisis Fitoquímico de la corteza de *Alnus acuminata* sbsp. *Arguta* (Schlecht.) Furlow". Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Farmacia.

- Instituto de Biología , Universidad Nacional Autónoma de México pagina web : http://www.arboles.org/paginas/alnus_acuminata.html.

- Keinänen M., Julkunen-Tiitto R. (1998). High-Performance Liquid Chromatographic determination of Flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* Leaves, *Journal of Chromatography A*, **793**, 370-377



-
- KiHwan B., Wen Y.J., Xing F.C., Minkyun N., Jung J.L. (2007). Diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* inhibit the NF- κ B Activation and NO and TNF- α Production. *Biol. Pharm. Bull.* 30:810-813
- Kuroyanagi, M., Shimomae M., Nagashiwa Y., Muto N., Okuda T., Kawahara N., Nakane N., and Sano T., (2005). New Diarylheptanoids from *Alnus japonica* and their Antioxidative Activity. *Chem. Pharm. Bull.* 53: 1519-1523
- Klischies M., Zenk M. (1978). Stereochemistry of C-Methylation in the Biosynthesis of Rhododendrin in *Alnus* and *Betula*, *Phytochemistry*, **17**, 1281-1284.
- Mañes S., Recio. C., Giner R., Ríos J. L. (1997). Effect of Selected Triterpenoids on Chronic Dermal Inflammation, *European Journal of Pharmacology*, **334**, 103-105.
- Mañes S. Recio M. C. , Gil I., Giner R., Gomez R M ., Waterman P. , Rios JL (1999) Glycosyl Analogue of Diacylglycerol and Other Antiinflammatory Constituents from *Inula viscosa*. *Journal of Natural Products*, 62, 601-604
- Martínez J. (1984). La Flora de Veracruz, Editorial El Ateneo, Fascículo no. 20, Xalapa Veracruz México, 128-136
- Matsuda H., Ishikado A., Nishida N., Ninomiya K., Fujiwara H., Kobayashi Y. y Masayuki Y. (1998). Hepatoprotective, Superoxide Scavenging, and Antioxidative Activities of Aromatic Constituents from the Bark of *Betula platyphylla* var. *japonica*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **8**, 2939-2944.
- Min-Won L., Jung- Hwan K., Dong-Wook J. Kyoung-Hwan A., Sang-Hak T., Young-Jonn S. (2000). Inhibition of Cyclooxygenase-2 Expression by Diarylheptanoid from the Bark of *Alnus hirsute* var. *sibirica*, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **23**:517-518.



-
- Murillo O., Finkeldey R. (2000). Genetic diversity in natural populations of *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (Schlecht.) Furlow in Costa Rica and Panama. *Forest Genetics*, 7:121-131.
- Patwardhan B. and Gautam M. (2005) Botanical Immunodrugs and Opportunities. *Drugs Discovery Today*. 10: 495-501.
- Peres V., Tanus J., Faustino de Oliveira F. (2000). Tetraoxygenated Naturally Occurring Xanthenes, *Phytochemistry*, **55**, 683-710.
- Pettipher, E.R., Higgs, G.A. and Salmon, J.A. (1992) Eicosanoids (prostaglandins and leukotrienes). En: *Biochemistry of inflammation*, Ed. Wicher J.T. and Evans, S.W. Klower Academic Publishers, 91-107.
- Plaeger S.F.,(2003). Clinical Immunology and Traditional Herbal Medicines. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 10:337-338.
- Ritch-Krc E.M., Turner N.J., Towers G.H.N. (1996). Carrier Herbal Medicine: Traditional and Contemporary Plant Use, *Journal of Ethnopharmacology*, **52**, 85-94.
- Rovelo-Martínez, A. R. (2002). "Estudio de la interacción sinérgica de *Phytolacca americana* L. y *Alnus acuminata* sbsp. *arguta* (Schlecht) Furlow como agentes antiinflamatorios en rata Wistar". Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Salama A.M., Rincon J., Torres M.A., e Iregui C. (1997), Efecto abortivo, aislamiento e identificación de principios activos de *Alnus acuminata*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 25:36-38.



- Salama A.M., Avendaño Y.I. (2005). Actividad Antiinflamatoria de δ -amirona y 4',7-dimetoxiapigenina aislados de *Alnus acuminata*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 34: 117-121.

- Santamour F., Lundgren L. (1997). Rhododendrin in *Betula*: a Reappraisal, *Biochemical Systematics and Ecology*, **25**: 335-341.

- Steele C.P., J.C. Warhurst D. C., Kirby G. y Simmonds M. (1999). *In vitro* and *In vivo*, Evaluation of Betulinic Acid as an Antimalarial, *Phytotherapy Research*, **13**, 115-119.

- Syntex, Simposium (1987); Inflamación y antiinflamatorios 23-29, 61-83, 97-99.

- Tallarida R.J., Murray R.B. (1981). Manual of Pharmacological Calculations. Ed. Springer-Verlay, New York, 61-83, 22-26.

- Tori M., Kasushi H., Yoshinori A. (1995). Diarylheptanoids, Flavonoids, Stilbenoids, Sesquiterpenoids and Phenanthrene from *Alnus maximowiczii*, *Phytochemistry*, **40**:1263-1264

- W.H. Freeman and Company books and textbooks in science:
<http://www.whfreeman.com/immunology5e>

- Wikipedia Foundation Incorporation:
<http://es.wikipedia.org/wiki/Alnus>

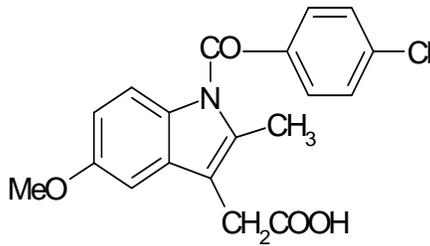
- Winrock International Organization:
http://www.winrock.org/fnrm/factnet/factpub/FACTSH/A_acuminata.html

- Winter CA., Risley EA (1962); Carrageenin-induce Edema in Hind Paw of the Rat, as an Assay for Antiinflammatory Drugs, *Proceedings of Society of Biology Medical*. 111, 544-547

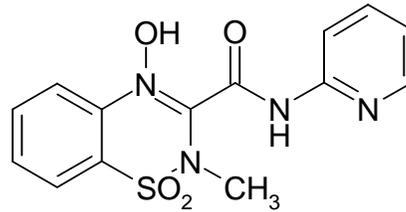


Anexo A

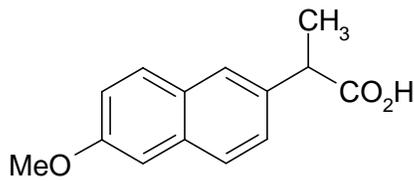
Estructuras Químicas de Fármacos Antiinflamatorios No Esteroidales
(FAINE'S)



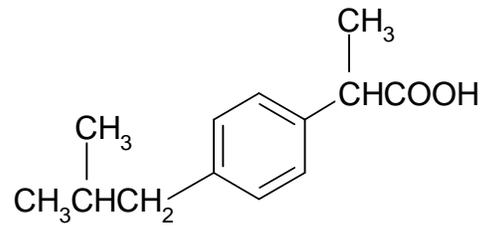
INDOMETACINA



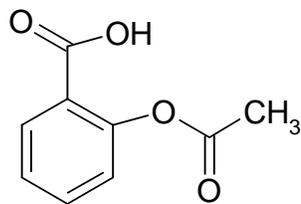
PIROXICAM



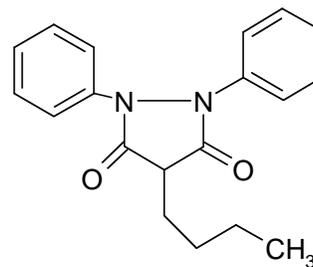
NAPROXENO



IBUPROFENO



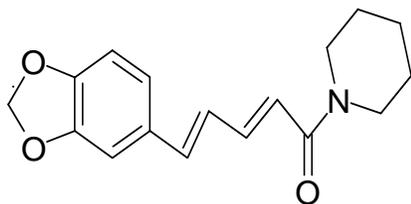
ACIDO ACETILSALICILICO



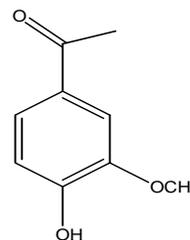
FENILBUTAZONA



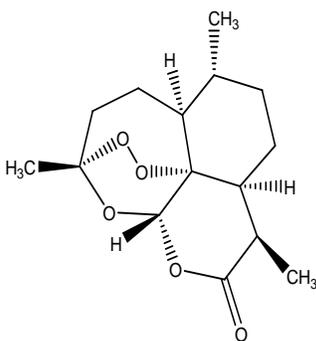
Anexo B
Estructuras Químicas Aisladas de Productos Naturales con Actividad sobre el
Sistema Inmunológico (Pathwardhan, 2005).



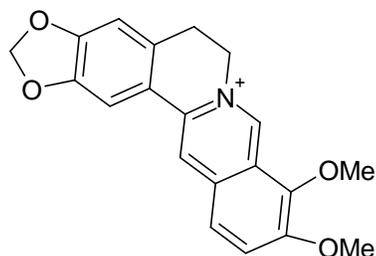
PIPERINA



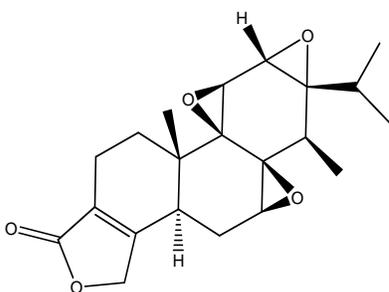
APOCININA



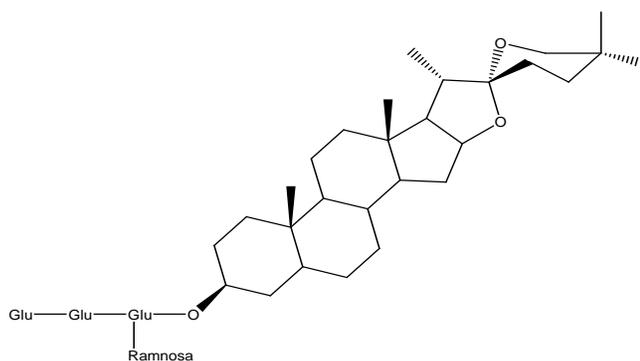
ARTEMISINA



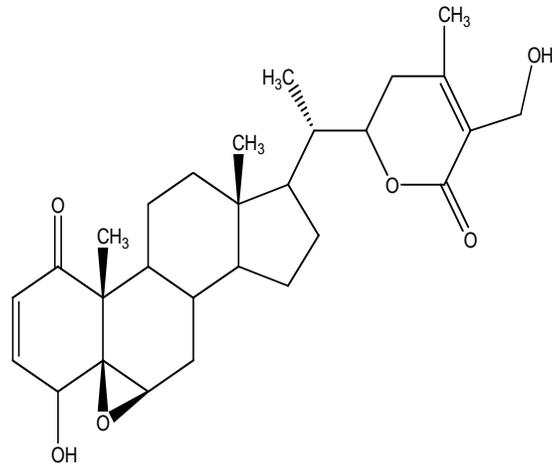
BERBERINA



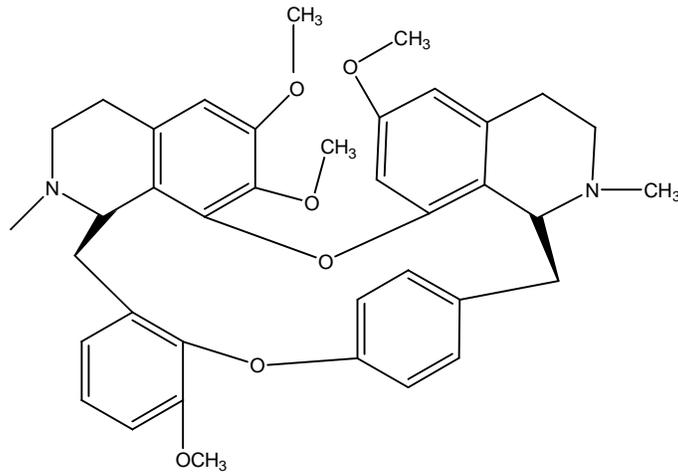
TRIPTOLIDO



SHATAVARINA



WITHAFERINA A



SINOMENINA