



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS MARCADORES DE LA
ACTIVIDAD ANTI INFLAMATORIA DE *Alnus acuminata* ssp. *arguta*.
ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA CORTEZA Y DE LA
MADERA

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. CRISTIAN ALVARADO LÓPEZ

TUTORA:

DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS
MARCADORES DE LA ACTIVIDAD ANTI INFLAMATORIA DE
Alnus acuminata ssp. arguta. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA CORTEZA Y DE LA MADERA.**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q.F.B. CRISTIAN ALVARADO LÓPEZ



TUTORA: DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, 2016

Jurado

Presidente	Dra. Rachel Maya Essayag
Vocal	Dr. Mariano Martínez Vázquez
Vocal	M. en C. Baldomero Esquivel
Vocal	Dra. Lilián Yépez Mulia
Secretario	Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS:

Laboratorio 111, Conjunto E, Departamento de Farmacia.

Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) a través del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas y a la Facultad de Química por la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (número de becario: 308765).

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents por su gran apoyo incondicional, permanente, su constancia, paciencia y dedicación en el desarrollo del presente trabajo, así como por su gran calidad académica, profesional y por su apoyo personal que recibí en todo momento.

A los honorables miembros del jurado de mi examen de grado, Dra. Rachel Mata Essayag, Dr. Mariano Martínez Vázquez, M. en C. Baldomero Esquivel, Dra. Lilián Yépez Mulia y Dra. Blanca Estela Rivero Cruz por sus valiosas aportaciones y comentarios para la corrección del presente trabajo.

Al M. en C. Gonzalo Lara Issasi y al M. en C. Alberto Cedillo Cruz por su gran apoyo en todo momento respecto a la realización de mi proyecto, su atención, asesoría académica, dedicación, esmero y profesionalismo.

Al M. en C. Gonzalo Lara Isassi, a la M. en C. María Teresa Ramírez Apan y al M. en C. Antonio Nieto Camacho, por su valiosa orientación para la realización de los estudios de actividad antiinflamatoria.

A la DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM), Proyecto PAPIIT IN217914.

Al PAIP (Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado) por el proyecto 50009131.

Al personal técnico de la USAI por la obtención de los espectros IR, RMN y Rotación óptica: Q. Alejandrina Acosta, M. en C. Rosa Isela del Villar, Q. Maricela Gutiérrez, Dra. Minerva Monroy, Dra. María Isabel Chávez Uribe y Q. Rocío Patiño.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	ix
ÍNDICE DE ESPECTROS	x
1. ABSTRACT	xii
2. RESUMEN	xiii
3. INTRODUCCIÓN	1
3.1. Plantas medicinales y su importancia global según la OMS	1
3.2. Situación en México	1
4. ANTECEDENTES	2
4.1. Familia Betulaceae	2
4.1.1. Género <i>Alnus</i>	2
4.1.2. Composición química del género <i>Alnus</i>	2
4.1.3. Usos tradicionales y medicinales del género <i>Alnus</i>	10
4.1.4. Actividad farmacológica del género <i>Alnus</i>	11
4.1.5. Relación estructura/actividad de los diarilheptanoides aislados del género <i>Alnus</i>	11
4.2. <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i>	12
4.2.1. Nombres comunes de <i>A. acuminata</i> ssp. <i>arguta</i>	12
4.2.2. Clasificación taxonómica de <i>A. acuminata</i> ssp. <i>arguta</i>	13
4.2.3. Usos medicinales y tradicionales en México de <i>A. acuminata</i>	13
4.2.4. Distribución geográfica de <i>A. acuminata</i>	13
4.2.5. Actividades farmacológicas de <i>A. acuminata</i> ssp. <i>arguta</i>	13
4.3. Biogénesis de los compuestos seleccionados como marcadores de <i>A. acuminata</i>	14
4.3.1. Fenilpropanoides	14
4.3.2. Diarilheptanoides	15
4.4. Compuestos marcadores de <i>A. acuminata</i> ssp. <i>arguta</i>	16
4.4.1. Oregonina	16
4.4.2. Hirsutanonol	17
4.4.3. Hirsutenona	17
4.5. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)	19
4.6. Validación de métodos analíticos	20
4.7. Inflamación	21
4.7.1. Ensayo <i>in-vitro</i> de la actividad antiinflamatoria mediante la enzima COX-II	22
4.7.2. Ensayo <i>in-vivo</i> mediante un modelo de inflamación de oreja de ratón inducido por TPA	23

5. HIPÓTESIS	24
6. JUSTIFICACIÓN	24
7. OBJETIVOS	25
7.1. Objetivo general.....	25
7.2. Objetivos particulares	25
8. PARTE EXPERIMENTAL	26
8.1. Desarrollo del método analítico por HPLC.....	26
8.2. Caracterización de los productos naturales.....	27
8.3. Obtención de productos naturales de la corteza de <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i>	27
8.3.1. Material vegetal.....	27
8.3.2. Preparación de extractos totales (orgánicos y acuosos).....	27
8.3.3. Fraccionamiento por reparto del extracto total	28
8.3.3.1. Análisis cromatográfico por UPLC/MS del extracto de AcOEt.....	29
8.3.3.2. Aislamiento de los diarilheptanoides I y IV a partir del extracto de AcOEt.....	30
8.3.3.3. Aislamiento de los diarilheptanoides II, III y IV a partir del extracto de 1-BuOH.....	32
8.3.3.4. Obtención de hirsutanonol (II) mediante reacción general de hidrólisis ácida	34
8.4. Validación del método analítico.....	35
8.4.1. Pruebas preliminares para la validación del método por HPLC.....	35
8.4.2. Método de extracción para la cuantificación por HPLC.....	39
8.4.2.1. Preparación de la matriz de trabajo	39
8.4.2.2. Determinación de los rangos de trabajo para cada compuesto marcador.....	39
8.4.2.3. Preparación de las soluciones stock	40
8.4.3. Validación del sistema por HPLC	41
8.4.3.1. Adecuabilidad del sistema	41
8.4.3.2. Precisión del sistema	41
8.4.3.3. Linealidad del sistema.....	41
8.4.3.4. Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC)	42
8.4.4. Validación del método por HPLC.....	42
8.4.4.1. Linealidad y exactitud del método	42
8.4.4.2. Precisión del método	42
8.4.4.3. Repetibilidad	42
8.4.4.4. Precisión intermedia o tolerancia interdía/analista.....	43
8.4.5. Estabilidad analítica de la muestra.....	43
8.4.6. Cuantificación de los compuestos mayoritarios en <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i>	43
8.5. Pruebas de actividad antiinflamatoria	44
8.5.1. Ensayo <i>in-vitro</i> de la actividad antiinflamatoria mediante la enzima COX-II	44
8.5.2. Ensayo <i>in-vivo</i> mediante un modelo de inflamación de oreja de ratón inducido con TPA	45

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
9.1. Análisis cromatográfico por UPLC/MS	47
9.2. Aislamiento y confirmación estructural de los compuestos mayoritarios	50
9.2.1. Aislamiento de (5S)-1,7-bis-(3,4-dihidroxifenil)-heptan-5-O-β-D-xilopiranosido (oregonina) [I]	50
9.2.2. Aislamiento y obtención de (5S)-1,7-bis-(3,4-dihidroxifenil)-heptan-5-ol (hirsutanonol) por hidrólisis ácida [II]	52
9.2.3. Aislamiento de (5S)-1,7-bis-(3,4-dihidroxifenil)-heptan-3-ona (platifilonol) [III]	54
9.2.4. Aislamiento de (E)-1,7-bis-(4-hidroxifenil)-3-hepten-3-ona (platifilonona) [IV]	56
9.3. Validación del método analítico por HPLC	58
9.3.1. Validación del sistema	58
9.3.1.1. Adecuabilidad del sistema	58
9.3.1.2. Precisión del sistema	59
9.3.1.3. Linealidad del sistema	59
9.3.1.3.1. Linealidad del sistema para la oregonina	60
9.3.1.3.2. Linealidad del sistema para el hirsutanonol	63
9.3.1.3.3. Linealidad del sistema para el platifilonol	66
9.3.1.3.4. Linealidad del sistema para la platifilonona	69
9.3.1.4. Límite de detección y límite de cuantificación	71
9.3.2. Validación del método por HPLC	73
9.3.2.1. Linealidad y exactitud del método	73
9.3.2.2. Precisión del método	84
9.3.2.2.1. Repetibilidad	84
9.3.2.2.2. Precisión del método (precisión intermedia o tolerancia interdía/analista)	86
9.3.3. Estabilidad analítica de la muestra	87
9.3.4. Cuantificación de los compuestos mayoritarios en los componentes de <i>Alnus acuminata ssp. arguta</i>	94
9.3.5. Pruebas de actividad antiinflamatoria	96
9.3.5.1. Ensayo preliminar <i>in-vitro</i> de la actividad antiinflamatoria utilizando la enzima COX-II	96
9.3.5.2. Ensayo <i>in-vivo</i> mediante un modelo de inflamación de oreja de ratón inducido con TPA	97
10. CONCLUSIONES	99
11. PERSPECTIVAS	100
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
13. ANEXO I. Espectros	106
14. ANEXO II. Lista de fórmulas estadísticas utilizadas en la validación analítica	153

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μV	Microvoltz
AA	Ácido araquidónico
Abs ó A	Absorbancia
AcOEt	Acetato de etilo
b_1	Pendiente
b_0	Ordenada al origen
1-BuOH	1-Butanol
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCDP	Cromatografía en columna delgada preparativa
CCF	Cromatografía en capa delgada
CD_3OD	Metanol deuterado
CH_3OH	Metanol
CDCl_3	Cloroformo deuterado
CDCl_3	Metanol
CG (GC)	Cromatografía de gases
CLAE (HPLC)	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
CI_{50}	Concentración Inhibitoria Media
COSY	Espectroscopía por correlación
COX	Ciclooxigenasa
C_r	Peso de la oreja de ratón tratada con TPA
^{13}C -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
C_t	Peso de la oreja de ratón tratada con TPA y producto de prueba
CV	Coefficiente de variación
$\text{CV}_{y/x}$	Coefficiente de variación de la regresión
δ	Desplazamiento químico
$ d_i $	Media aritmética comparativa respecto al factor inicial
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EM (MS)	Espectrometría de masas
ESI ⁻	Electrospray negativo
EtOH	Etanol
Exto.	Extracto
F	Factor de dilución
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
g	Gramo
HCl	Ácido clorhídrico
Hex	Hexano

HIF-1	Factor Inducible de Hipoxia 1
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces
H ₂ O	Agua
¹ H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear protónica
HSQC	Correlación monocuántica heteronuclear
IC(β_0)	Intervalo de confianza para la ordenada al origen
IC(β_1)	Intervalo de confianza para la pendiente
IC(μ)	Intervalo de confianza para la media poblacional
IL	Interleucina
iNOS	Inhibidor de la sintasa de óxido nítrico
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
λ	Longitud de onda
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
LOX	Lipooxigenasa
LPS	Lipopolisacáridos
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MHz	MegaHertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mg	Miligramo
μ M	Micromolar
m/z	Relación masa/carga
#	Número
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
NOESY	Espectroscopía por Efecto Nuclear Overhauser
OMS	Organización Mundial de la Salud
PG	Prostaglandinas
PLM	Polimorfonucleares
ppm	Partes por millón
<i>r</i>	Coefficiente de correlación lineal
<i>r</i> ²	Coefficiente de determinación
R _f	Factor de retención
rpm	Revoluciones por minuto
R.T.	Tiempo de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
S (SD ó DS)	Desviación estándar
ssp.	Subespecie
TMS	Tetrametilsilano
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPA	13-acetato de-12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol

u.a.	Unidades de absorbancia
UPLC	Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Eficiencia
USAI	Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación
UV	Ultravioleta
VIS	Visible
\bar{y}	Media aritmética
\bar{y}_0	Media aritmética de análisis inicial
\bar{y}_1	Media aritmética para cada factor
z	Carga

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Descripción del uso medicinal tradicional de <i>quetzalilin</i> (aliso) en el código Badiano.	10
Figura 2	Estructura general de un diarilheptanoide en función a la relación estructura/actividad.	11
Figura 3	Representación de un árbol característico de <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i> (<i>Schlechtendal</i>) Furlow, con sus hojas, frutos y brotes basales.	
Figura 4	Esquema general de la biogénesis de los compuestos C ₆ -C ₃ .	14
Figura 5	Esquema general de la ruta biogenética de los diarilheptanoides.	15
Figura 6	Estructura química del compuesto oregonina.	16
Figura 7	Estructura química del compuesto hirsutanonol.	17
Figura 8	Estructura química del compuesto hirsutenona.	17
Figura 9	Estructura química de los compuestos platifilonol y platifilenona.	18
Figura 10	Diagrama general de la biogénesis de la prostaglandina PGF _{2α} a partir de ácido araquidónico (AA).	22
Figura 11	Diagrama general del fraccionamiento de la materia vegetal para la obtención de extractos de AcOEt y 1-BuOH.	28
Figura 12	Estructura química de los compuestos I y IV obtenidos del extracto de AcOEt.	30
Figura 13	Diagrama del fraccionamiento cromatográfico del extracto de AcOEt.	31
Figura 14	Estructura química de los compuestos II , III y IV obtenidos del extracto de 1-BuOH.	32
Figura 15	Diagrama del fraccionamiento cromatográfico del extracto de 1-BuOH.	34
Figura 16	Cromatograma de la mezcla de los cuatro compuestos marcadores: oregonina (I), hirsutanonol (II), platifilonol (III) y platifilenona (IV).	35
Figura 17	Cromatograma del extracto de MeOH de la corteza y de la madera de <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i> . Identificación de: oregonina (I), hirsutanonol (II), platifilonol (III) y platifilenona (IV).	36
Figura 18	Cromatograma del extracto de MeOH de la corteza de <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i> . Identificación de: oregonina (I), hirsutanonol (II), platifilonol (III) y platifilenona (IV).	36
Figura 19	Cromatogramas del extracto de MeOH de la corteza y de la madera de <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i> enriquecidos con: oregonina (I), hirsutanonol (II), platifilonol (III) y platifilenona (IV).	37
Figura 20	Cromatograma del extracto de MeOH de la corteza de <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i> enriquecidos con oregonina (I), hirsutanonol (II), platifilonol (III) y platifilenona (IV).	38
Figura 21	Diagrama general para el desarrollo de la validación del método analítico por HPLC para la cuantificación de los compuestos marcadores de <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i> .	40
Figura 22	Cromatograma obtenido por el análisis de UPLC/MS del extracto de AcOEt de <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i> . Identificación de oregonina (I) e hirsutanonol (II).	47
Figura 23	Espectro de masas correspondiente a la oregonina por la técnica ESI ⁻ .	48
Figura 24	Patrón de fragmentación de la oregonina (I) por la técnica ESI ⁻ .	48

Figura 25	Espectro de masas correspondiente al hirsutanonol $[M-H]^-$ por la técnica ESI $^-$.	49
Figura 26	Patrón de fragmentación para el hirsutanonol (II) por la técnica ESI $^-$.	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Principales compuestos químicos descritos en la literatura.	3
Tabla 2	Clasificación taxonómica de <i>Alnus acuminata ssp. arguta</i> .	12
Tabla 3	Condiciones analíticas para la obtención de los compuestos mayoritarios por cromatografía de líquidos preparativa y para la realización del método de validación y cuantificación por HPLC.	26
Tabla 4	Determinación de las concentraciones de trabajo para cada compuesto marcador.	39
Tabla 5	Parámetros cromatográficos para la adecuabilidad del sistema.	41
Tabla 6	Material y condiciones para el ensayo <i>in-vivo</i> de inducción de edema de oreja por TPA.	45
Tabla 7	Datos espectroscópicos de la oregonina (I).	50
Tabla 8	Datos espectroscópicos del hirsutanonol (II).	52
Tabla 9	Datos espectroscópicos del platifilonol (III).	54
Tabla 10	Datos espectroscópicos de la platifilenona (IV).	56
Tabla 11	Resultados para la adecuabilidad del sistema.	58
Tabla 12	Resultados y parámetros cromatográficos para la adecuabilidad del sistema.	58
Tabla 13	Resultados para la precisión del sistema.	59
Tabla 14	Resultados de la linealidad del sistema para la oregonina.	60
Tabla 15	Parámetros cromatográficos de la linealidad del sistema para la oregonina.	61
Tabla 16	Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del sistema para la oregonina.	61
Tabla 17	Análisis de varianza de la linealidad del sistema para la oregonina.	62
Tabla 18	Resultados de la linealidad del sistema para el hirsutanonol.	63
Tabla 19	Parámetros cromatográficos de la linealidad del sistema para el hirsutanonol.	64
Tabla 20	Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del sistema para el hirsutanonol.	64
Tabla 21	Análisis de varianza de la linealidad del sistema para el hirsutanonol.	65
Tabla 22	Resultados de la linealidad del sistema para el platifilonol.	66
Tabla 23	Parámetros cromatográficos de la linealidad del sistema para el platifilonol.	67
Tabla 24	Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del sistema para el platifilonol.	67
Tabla 25	Análisis de varianza de la linealidad del sistema para el platifilonol.	68
Tabla 26	Resultados de la linealidad del sistema para la platifilenona.	69

Tabla 27	Parámetros cromatográficos de la linealidad del sistema para la platifilenona.	70
Tabla 28	Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del sistema para el platifilenona.	70
Tabla 29	Análisis de varianza de la linealidad del sistema para el platifilenona.	71
Tabla 30	Resultados para LD y LC y obtención de la curva de calibración lineal.	72
Tabla 31	Resultados para LD y LC para los compuestos mayoritarios de <i>Alnus acuminata ssp. arguta</i> .	73
Tabla 32	Resultados para la linealidad del método.	74
Tabla 33	Parámetros cromatográficos de la linealidad del método para la oregonina.	75
Tabla 34	Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método para la oregonina.	75
Tabla 35	Análisis de varianza de la linealidad del método para la oregonina.	76
Tabla 36	Parámetros cromatográficos de la linealidad del método para el hirsutanonol.	77
Tabla 37	Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método para el hirsutanonol.	77
Tabla 38	Análisis de varianza de la linealidad del método para el hirsutanonol.	78
Tabla 39	Parámetros cromatográficos de la linealidad del método para el platifilonol.	79
Tabla 40	Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método para el platifilonol.	79
Tabla 41	Análisis de varianza de la linealidad del método para el platifilonol.	80
Tabla 42	Parámetros cromatográficos de la linealidad del método para la platifilenona.	81
Tabla 43	Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método para la platifilenona.	81
Tabla 44	Análisis de varianza de la linealidad del método para la platifilenona.	82
Tabla 45	Resultados para la exactitud del método.	83
Tabla 46	Resultados y parámetros cromatográficos para la exactitud del método.	84
Tabla 47	Resultados para la evaluación de la repetibilidad.	85
Tabla 48	Parámetros cromatográficos para la repetibilidad.	85
Tabla 49	Resultados obtenidos para la precisión interdía.	86
Tabla 50	Parámetros cromatográficos para la precisión intermedia.	86
Tabla 51	Resultados para la estabilidad analítica de la muestra a 4°C en ausencia de luz.	88

Tabla 52	Resultados para la estabilidad analítica de la muestra a 4°C en presencia de luz.	89
Tabla 53	Resultados para la estabilidad analítica de la muestra a temperatura ambiente en ausencia de luz.	90
Tabla 54	Resultados para la estabilidad analítica de la muestra a temperatura ambiente en presencia de luz.	91
Tabla 55	Resultados para la estabilidad analítica de la muestra a 37°C en ausencia de luz.	92
Tabla 56	Resultados finales para las pruebas de estabilidad analítica.	93
Tabla 57	Resultados de la cuantificación de metabolitos en los componentes de la corteza de <i>Alnus acuminata ssp. arguta</i> .	95
Tabla 58	Resultados preliminares de la capacidad anti inflamatoria en el ensayo <i>in-vitro</i> de la enzima COX-II.	96
Tabla 59	Resultados de la actividad anti inflamatoria utilizando el modelo <i>in-vivo</i> de inflamación de oreja inducido por TPA.	97

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Linealidad del sistema para la oregonina.	61
Gráfico 2	Gráfico de residuales para el modelo de linealidad del sistema para la oregonina.	62
Gráfico 3	Linealidad del sistema para el hirsutanonol.	64
Gráfico 4	Gráfico de residuales para el modelo de linealidad del sistema del el hirsutanonol.	65
Gráfico 5	Linealidad del sistema para el platifilonol.	67
Gráfico 6	Gráfico de residuales para el modelo de linealidad del sistema del el platifilonol.	68
Gráfico 7	Linealidad del sistema para la platifilenona.	70
Gráfico 8	Gráfico de residuales para el modelo de linealidad del sistema para la platifilenona.	71
Gráfico 9	Linealidad del método para la oregonina.	75
Gráfico 10	Gráfico de residuales para el modelo de linealidad del método para la oregonina.	76
Gráfico 11	Linealidad del método para el hirsutanonol.	77
Gráfico 12	Gráfico de residuales para el modelo de linealidad del método para el hirsutanonol.	78
Gráfico 13	Linealidad del método para el platifilonol.	79
Gráfico 14	Gráfico de residuales para el modelo de linealidad del método para el platifilonol.	80
Gráfico 15	Linealidad del método para la platifilenona.	81
Gráfico 16	Gráfico de residuales para el modelo de linealidad del método para la platifilenona.	82
Gráfico 17	Gráfico comparativo del contenido metabólico de los diferentes componentes de <i>Alnus acuminata ssp. arguta</i> .	95

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1	Espectro ^1H -RMN de oregonina, CD_3OD , 400 MHz.	99
Espectro 2	Espectro ^{13}C -RMN de oregonina, CD_3OD , 100 MHz.	100
Espectro 3	Espectro ^1H - ^1H COSY de oregonina (ampliación 1).	101
Espectro 4	Espectro ^1H - ^1H COSY de oregonina (ampliación 2).	102
Espectro 5	Espectro ^1H - ^1H COSY de oregonina (ampliación 3).	103
Espectro 6	Espectro ^1H - ^{13}C HSQC de oregonina (ampliación 1).	104
Espectro 7	Espectro ^1H - ^{13}C HSQC de oregonina (ampliación 2).	105
Espectro 8	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de oregonina (ampliación 1).	106
Espectro 9	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de oregonina (ampliación 2).	107
Espectro 10	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de oregonina (ampliación 3).	108
Espectro 11	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de oregonina (ampliación 4).	109
Espectro 12	Espectro ^1H - ^1H NOESY de oregonina (ampliación 1).	110
Espectro 13	Espectro ^1H - ^1H NOESY de oregonina (ampliación 2).	111
Espectro 14	Espectro ^1H - ^1H NOESY de oregonina (ampliación 3).	112
Espectro 15	Espectro ^1H -RMN de hirsutanonol, CD_3OD , 400 MHz.	113
Espectro 16	Espectro ^{13}C -RMN de hirsutanonol, CD_3OD , 100 MHz.	114
Espectro 17	Espectro ^1H - ^1H COSY de hirsutanonol (ampliación 1).	115
Espectro 18	Espectro ^1H - ^1H COSY de hirsutanonol (ampliación 2).	116
Espectro 19	Espectro ^1H - ^{13}C HSQC de hirsutanonol.	117
Espectro 20	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de hirsutanonol (ampliación 1).	118
Espectro 21	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de hirsutanonol (ampliación 2).	119
Espectro 22	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de hirsutanonol (ampliación 3).	120
Espectro 23	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de hirsutanonol (ampliación 4).	121
Espectro 24	Espectro ^1H - ^1H NOESY de hirsutanonol (ampliación 1).	122
Espectro 25	Espectro ^1H - ^1H NOESY de hirsutanonol (ampliación 2).	123
Espectro 26	Espectro ^1H -RMN de platifilonol, CD_3OD , 500 MHz.	124
Espectro 27	Espectro ^{13}C -RMN de platifilonol, CD_3OD , 500 MHz.	125
Espectro 28	Espectro ^1H - ^1H COSY de platifilonol (ampliación 1).	126
Espectro 29	Espectro ^1H - ^1H COSY de platifilonol (ampliación 2).	127
Espectro 30	Espectro ^1H - ^{13}C HSQC de platifilonol.	128
Espectro 31	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de platifilonol (ampliación 1).	129
Espectro 32	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de platifilonol (ampliación 2).	130
Espectro 33	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de platifilonol (ampliación 3).	131
Espectro 34	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de platifilonol (ampliación 4).	132
Espectro 35	Espectro ^1H - ^1H NOESY de platifilonol (ampliación 1).	133
Espectro 36	Espectro ^1H - ^1H NOESY de platifilonol (ampliación 2).	134
Espectro 37	Espectro ^1H -RMN de platifilenona, CDCl_3 , 400 MHz.	135
Espectro 38	Espectro ^{13}C -RMN de platifilenona, CDCl_3 , 400 MHz.	136
Espectro 39	Espectro ^1H - ^1H COSY de platifilenona (ampliación 1).	137
Espectro 40	Espectro ^1H - ^1H COSY de platifilenona (ampliación 2).	138

Espectro 41	Espectro ^1H - ^1H COSY de platifilenona (ampliación 3).	139
Espectro 42	Espectro ^1H - ^{13}C HSQC de platifilenona.	140
Espectro 43	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de platifilenona (ampliación 1).	141
Espectro 44	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de platifilenona (ampliación 2).	142
Espectro 45	Espectro ^1H - ^{13}C HMBC de platifilenona (ampliación 3).	143
Espectro 46	Espectro ^1H - ^1H NOESY de platifilenona (ampliación 1).	144
Espectro 47	Espectro ^1H - ^1H NOESY de platifilenona (ampliación 2).	145

1. ABSTRACT

Four compounds, oregonin (**I**), hirsutanonol (**II**), platyphyllonol (**III**) and platyphyllenone (**IV**) were isolated from the bark and wood of *Alnus acuminata* ssp. *arguta*. The bark of *Alnus acuminata* (aile) is used in Traditional Mexican Medicine as an anti inflammatory product for the treatment of scrofula, syphilis, rheumatic conditions and infectious skin diseases.

Chemical and structural identity of the compounds **I**, **II**, **III** (not previously described in the species) and **IV** was confirmed and isolated from the bark and wood of *A. acuminata* by NMR technique (^1H and ^{13}C).

An HPLC analytical method was developed to simultaneous quantification of **I–IV** contained in the MeOH extracts of bark and wood of "aile". The optimal HPLC separation conditions were overtaken with a reverse phase Symmetry C18 column. This method resulted simple, accurate and applicable for the quantification of the chemical constituents of the medicinal bark. Afterwards, the HPLC method was validated according to International Conference on Harmonization (ICH) guidelines and the Mexican Pharmacopeia (FEUM). The amounts of **I**, **II**, **III** and **IV** quantified were 3.52, 0.70, 1.24, 0.12 and 0.11, 0.05, 0.07 and 0.01 mg/g in the bark and bark and wood, respectively.

An anti inflammatory activity test was performed to assess the ability of the aqueous extracts of the single bark and the bark and wood using an *in-vitro* model of inhibition of COX-II and an *in-vivo* model of inflammation ear rat induced by TPA. The bark showed greater anti inflammatory activity (IC_{50} of 83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 17.57% of inhibition), as a result from higher marker compounds contents compared to wood activity (IC_{50} of 113 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 13.67% of inhibition).

2. RESUMEN

Cuatro compuestos: oregonina (**I**), hirsutanonol (**II**), platifilonol (**III**) y platifilenona (**IV**) fueron aislados de la corteza y la madera de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*. La corteza de *Alnus acuminata* (aile) es utilizada en la medicina tradicional mexicana como un producto antiinflamatorio para el tratamiento de la esrófula, sífilis, condiciones reumáticas y enfermedades infecciosas de la piel.

La identidad química y estructural de los compuestos **I**, **II**, **III** (no descrito previamente en la especie) y **IV** aislados de la corteza y de la madera de *Alnus acuminata* fue confirmada por la técnica de RMN (^1H y ^{13}C).

Un método analítico por HPLC se desarrolló para la cuantificación simultánea de los compuestos **I-IV** contenidos en los extractos de MeOH de la corteza y la madera del “aile”. Las condiciones óptimas de separación por HPLC fueron realizadas con una columna Symmetry C_{18} de fase reversa. Éste método es simple, preciso y aplicable para la cuantificación de los componentes químicos de la corteza medicinal. Posteriormente, el método por HPLC fue validado de acuerdo al Comité Internacional de Armonización (ICH) y la Farmacopea Mexicana (FEUM). Las cantidades de **I**, **II**, **III** y **IV** cuantificados son 3.52, 0.70, 1.24, 0.12 y 0.11, 0.05, 0.07 y 0.01 mg/g de la corteza y de la corteza y madera, respectivamente.

Las pruebas de actividad antiinflamatoria se realizaron para evaluar la capacidad de los extractos acuosos de la corteza y de la corteza y madera utilizando un modelo *in-vitro* de inhibición de COX-II y un modelo *in-vivo* de inflamación de oreja de rata inducido por TPA. La corteza mostró una mayor actividad antiinflamatoria (IC_{50} de 83 $\mu\text{g/mL}$ y 17.57% de inhibición) como resultado de un mayor contenido de los compuestos marcadores en comparación con la actividad de la madera (IC_{50} de 113 $\mu\text{g/mL}$ y 13.67% de inhibición).

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Plantas medicinales y su importancia global según la OMS

Desde el año 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoció la importancia de la medicina tradicional como una alternativa para la población mundial. En 2013, la misma organización realizó una serie de recomendaciones para tratar de resolver los problemas y necesidades actuales de la población, proporcionando a las autoridades sanitarias alternativas que permitirán el paulatino mejoramiento de la salud de los pacientes por medio del desarrollo de bases de conocimiento y formulaciones de políticas nacionales. Asimismo, la OMS sugirió el establecimiento de reglamentaciones para fortalecer la seguridad, calidad y eficacia de las plantas medicinales, así como el fomento de una cobertura sanitaria universal que permita integrar los servicios de la medicina tradicional y complementaria en los sistemas nacionales de salud. Por esta razón, los comités internacionales de legislación regulatoria de plantas medicinales han implementado diversas estrategias para la autorización, expendio, fabricación y comercialización que permitan asegurar la inocuidad, calidad y eficacia de las plantas medicinales¹.

A la fecha los productos naturales han sido ampliamente utilizados para tratar enfermedades humanas, desempeñando un papel importante para el descubrimiento de fármacos y el desarrollo de medicamentos eficaces y de calidad².

3.2. Situación en México

El empleo de plantas medicinales como recurso terapéutico en la medicina tradicional mexicana ha sido de gran importancia debido a su uso en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades prevalentes en México. Por lo cual, es necesaria la disponibilidad de productos de calidad, eficaces y seguros. Una de estas materias primas, la planta medicinal "aile" (*Alnus acuminata* ssp. *arguta*), de la familia Betulaceae es ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana y requiere de un estudio para establecer los criterios de calidad que permitan su uso adecuado. Lo anterior será de importancia para su eventual inclusión en una monografía dentro de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM).

¹ World Health Organization. Medicina tradicional, World Health Organization. Ginebra, Swiss (2013).

² Cragg *et al.*, 1997.

4. ANTECEDENTES

4.1. Familia Betulaceae

La familia Betulaceae pertenece al grupo de las Angiospermas que incluye seis géneros de árboles o arbustos dicotiledóneos caducifolios y monoicos; con nueces de soporte de hoja caduca. Estos géneros son: *Alnus* (alisos), *Betula* (abedules), *Carpinus* (carpes), *Corylus* (madera de hierro), *Ostrya* (avellano) y *Ostryopsis* (avellano carpe), los cuales comprenden 130 especies de la familia alrededor del mundo³. Son árboles nativos de las regiones templadas de los trópicos y zonas de montaña del hemisferio norte, encontrándose también pocas especies en América del sur⁴. El género *Betula* es el más extenso de la familia Betulaceae⁵, del cual se ha utilizado la corteza y diferentes extractos en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias, como la artritis⁶.

4.1.1. Género *Alnus*

El género *Alnus* contiene 30 diferentes especies, de las cuales las más representativas por los estudios realizados son: *Alnus hirsuta* variedad *sibirica*, *Alnus rubra*, *Alnus glutinosa*, *Alnus incana*, *Alnus oregana*, *Alnus acuminata* ssp. *arguta*, *Alnus cordata*, *Alnus trabeculosa*⁷, *Alnus nepalensis*⁸ y *Alnus japonica*⁹, entre otras.

4.1.2. Composición química del género *Alnus*

Diversas entidades químicas han sido aisladas y reportadas del género *Alnus*, entre las que destacan compuestos como: terpenos, esteroides, estilbenos, flavonoides, fenilpropanoides, taninos y diarilheptanoides, etc.^{10,11} (**Tabla 1**).

³ Sati *et al.*, 2011.

⁴ Rastogi *et al.*, 2015.

⁵ La lista de plantas. Una lista trabajada de todas las especies de plantas (biblioteca en línea). Versión 1.1, septiembre de 2013. <http://www.theplantlist.org>. Citado: febrero de 2016.

⁶ Dadáková *et al.*, 2010.

⁷ Miyamoto *et al.*, 2002.

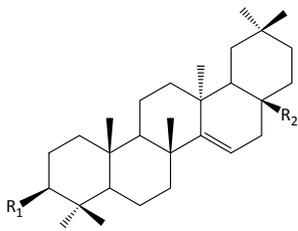
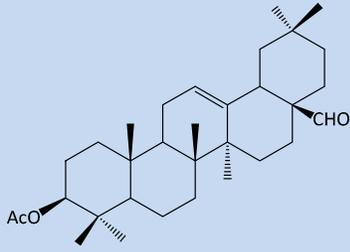
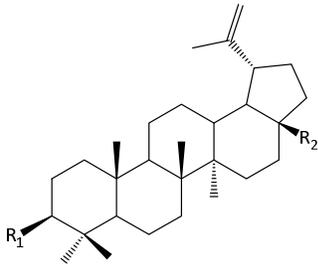
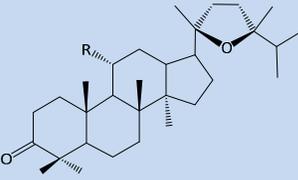
⁸ Yadav *et al.*, 2013.

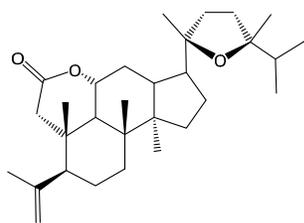
⁹ Kim *et al.*, 2005.

¹⁰ Park *et al.*, 2010.

¹¹ Lee *et al.*, 1992.

Tabla 1. Principales compuestos químicos descritos en la literatura.

Terpenoides				
Fórmula	Metabolitos secundarios	Especies representativas	Droga utilizada	Referencias bibliográficas
	$R_1=C=O, R_2=CH_3$ 14-taraxeren-3-ona	<i>Alnus hirsuta</i> <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i>	Corteza del tallo	Matsunaga <i>et al.</i> , 1988; Kazuhito <i>et al.</i> , 1987.
	$R_1=OCOCH_3, R_2=H$ Acetato de taraxerilo			Jin <i>et al.</i> , 2007(a); Aguilar <i>et al.</i> , 2011; Valente <i>et al.</i> , 2004.
	$R_1=OH, R_2=H$ Taraxerol			Matsunaga <i>et al.</i> , 1988; Jin <i>et al.</i> , 2007(a).
	$R_1=\beta-OH$ 3β-hidroxi-14-taraxereno			Kazuhito <i>et al.</i> , 1987; Sakkurai <i>et al.</i> , 1987; Zoy <i>et al.</i> , 2006; Jutiviboonsuk <i>et al.</i> , 2007; Aguilar <i>et al.</i> , 2011.
	3β-O-acetil-olean-12-en-28-al	<i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i>	Corteza del tallo	Aguilar <i>et al.</i> , 2011.
	$R_1=OH, R_2=CH_2OH$ Betulina	<i>Alnus hirsuta</i>	Corteza del tallo	Kim <i>et al.</i> , 2002.
	$R_1=OH, R_2=COOH$ Ácido betulínico			Uddin <i>et al.</i> , 1994; Ragasa <i>et al.</i> , 2005.
	$R_1=\beta-OH, R_2=CH_3$ 3β-hidroxi-lup-20(29)-eno			Pohjala <i>et al.</i> , 2009.
	$R_1=\beta-OH, R_2=COH$ 3β-hidroxi-lup-20(29)-ene-28-al			$R_1=\beta-OH, R_2=OH$ 3β,28-dihidroxi-lup-20(29)-eno
	$R=H$ Alnincanona	<i>Alnus serrulatoides</i>	Flores	Ryabinin <i>et al.</i> , 1968.
	$R=OH$ Alnuserol			Aoki <i>et al.</i> , 1990.

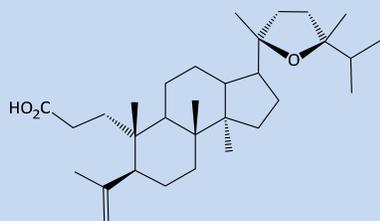


R=OH
Alnusolidol

Alnus serrulatoides

Flores

Aoki *et al.*, 1990.

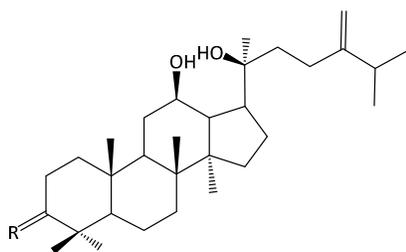


Ácido alnusérico

Alnus serrulatoides

Flores

Aoki *et al.*, 1990.



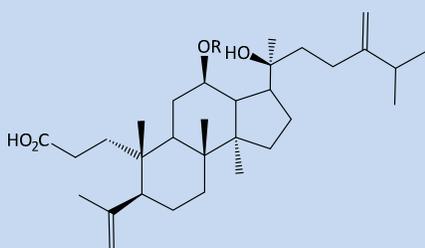
R=O
Alnuserrudiolona

Alnus serrulatoides

Flores

Aoki *et al.*, 1990.

R=OH
Alnuserrutriol



^I R=H
Ácido alnústico^I

^{II} R=(2'-OAc)- α -L-Ara
12-O-(2'-O-acetil)- α -L-arabinofuranósido^{II}

^{III} R= α -L-Ara
12-O- α -L-arabinofuranósido^{III}

^{IV} R=(2'-OAc)- β -D-Xyl
12-O-(2'-O-acetil)- β -D-xilopiranosido^{IV}

^V R= β -D-Xyl
12-O- β -D-xilopiranosido^V

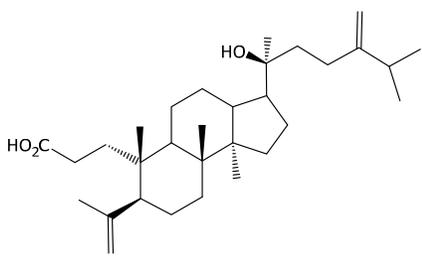
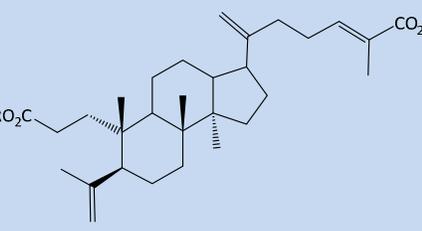
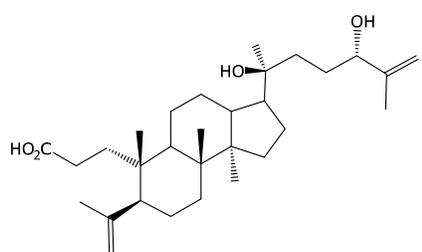
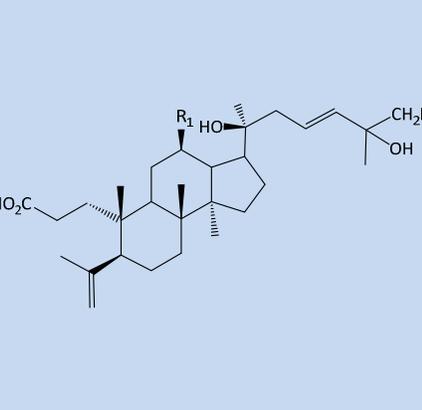
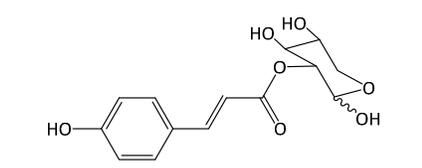
^{VI} R=(2'-OAc)- β -D-Glc
12-O-(2'-O-acetil)- β -D-glucopiranosido^{VI}

^{VII} R= β -D-Glc
12-O-(2'-O-acetil)- β -D-glucopiranosido^{VII}

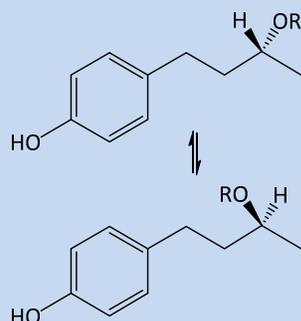
Alnus serrulatoides

^{I-III,}
^{V-VII} **Flores**
femeninas y masculinas.
^{IV} **Flores masculinas**

Aoki *et al.*, 1990.

	<p>Ácido 12-deoxialnústico</p>	<p><i>Alnus pendula</i></p>	<p>Flores</p>	<p>Aoki <i>et al.</i>, 1990.</p>
	<p>R=CH₃ Ácido-3-oato-(24E)-3,4-secodammara-4(28),20,24-trien-3,26-oico</p> <p>R=H Ácido-(24E)-3,4-secodammara-4(28),20,24-trien-3,26-oico</p>	<p><i>Alnus japónica</i> <i>Alnus sieboldiana</i></p>	<p>Flores</p>	<p>Aoki <i>et al.</i>, 1990.</p>
	<p>Ácido-(20S,24S)-20,24-dihidroxi-3,4-secodammara-4(28),25-dien-3-oico</p>	<p><i>Alnus japónica</i> <i>Alnus sieboldiana</i></p>	<p>Flores</p>	<p>Aoki <i>et al.</i>, 1990.</p>
	<p>R₁=R₂=H Ácido-(23E)-(20S)-20,25-dihidroxi-3,4-secodammara-4(28),23-dien-3-oico</p> <p>R₁=H, R₂=OH Ácido-(23E)-(20S)-20,25,26-trihidroxi-3,4-secodammara-4(28),23-dien-3-oico</p> <p>R₁=OH, R₂=H Ácido-(23E)-(12R,20S)-12,20,25-dihidroxi-3,4-secodammara-4(28),23-dien-3-oico</p>	<p><i>Alnus japónica</i> <i>Alnus sieboldiana</i></p>	<p>Flores</p>	<p>Aoki <i>et al.</i>, 1990.</p>
Fenilpropanoides				
	<p>2-O-p-Cumaroi-α/β-D-xilopiranosido</p>	<p><i>Alnus formosana</i></p>	<p>Hojas</p>	<p>Yi-Chun Lai <i>et al.</i>, 2012.</p>

Fenilbutanoides



R=β-D-Glcp
Rhododendrina

R=H
Rhododendrol

R=α-L-Araf-(1→6)-β-D-Glcp
2-O-α-L-arabinofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosido

R=β-D-Apif-(1→6)-β-D-Glcp
(2R)-4-(4-hidroxifenil)-2-butanol-2-O-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosido

R=H
Platifilona

Betula pendula

Betula pubescens

Betula platyphylla

Alnus japonica

Corteza interior

Santamour *et al.*, 1978; Santamour *et al.*, 1997.

Smith E., *et al.*, 1993.

Nomura *et al.*, 1981.

Diarylheptanoides lineales

R₁=R₂=OH, R₃=O-Xil
Oregonina

R₁=R₂=OH, R₃=O-Glc
Hirsutanonol 5-O-β-D-glucopiranosido

R₁=R₂=R₃=OH
Hirsutanonol

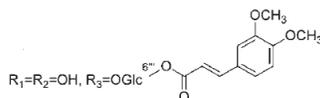
R₁=R₂=H, R₃=O-Glc
Platifilósido

R₁=R₂=H, R₃=O-Xil
Platifilonol 5-O-β-D-xilopiranosido

R₁=H, R₂=OH, R₃=O-Xil
Alnúsido A

R₁=OH, R₂=H, R₃=O-Xil
Alnúsido B

R₁=H, R₂=OH, R₃=O-Glc
(5S)-1-(4-hidroxifenil)-7-(3,4-dihidroxifenil)-5-O-β-D-glucopiranosil-heptan-3-ona



(5S)-1,7-bis-(3,4-dihidroxifenil)-5-O-β-D-[6-(3,4-dimetoxicinamoilglucopiranosil)]-heptan-3-ona

R₁=R₂=OH, R₃=O-CH₃
(5S)-O-metilhirsutanonol

Suga *et al.*, 1982.

Ohta S. *et al.*, 1984.

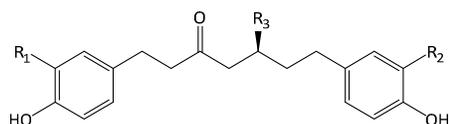
Smith *et al.*, 1993; Ohta *et al.*, 1985; Terazawa *et al.*, 1973; Sunnerheim *et al.*, 1988; Nagai M. *et al.*, 1986.

Ohta S. *et al.*, 1985; Nagai M. *et al.*, 1986.

Wada *et al.*, 1998.

Kuroyanagi M. *et al.*, 2005.

Yi-Chun Lai *et al.*, 2012.



Alnus rubra

Alnus serrulatoides

Alnus formosana

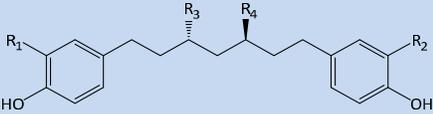
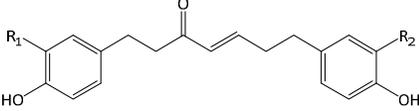
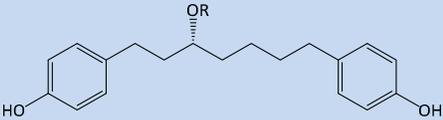
Betula platyphylla

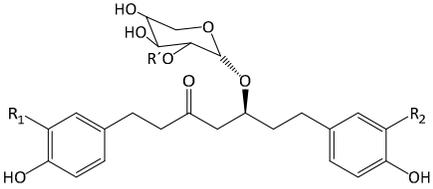
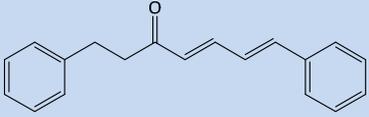
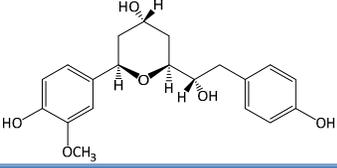
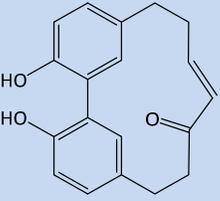
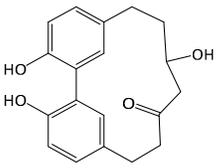
Betula pendula

Corteza verde

Corteza seca

Hojas

	$R_1=R_2=OH, R_3=O-nBu$ 5-O-butilhirsutanonol			
	$R_1=R_2=OH, R_3=O-nBu, \Delta^1 (E)$ (5S)-butiloxi-1,7-di(3,4-dihidroxifenil)-1-hepten-3-ona			
	$R_1=R_2=H, R_3=nBu$ (5S)-butiloxi-1,7-di(4-hidroxifenil)-3-heptanona			
	$R_1=R_2=OH, R_3=O-Glc, R_4=H$ Rubranósido A			
	$R_1=R_2=OH, R_3=O-Xil, R_4=H$ Rubranósido B			
	$R_1=R_2=OH, R_3=O-Xil-(3-1)-Glc, R_4=H$ Rubranósido C			
	$R_1=R_2=OH, R_3=OH, R_4=H$ Rubranol B			
	$R_1=R_2=R_3=OH, R_4=O-Xil$ 1,7-bis-(3,4-dihidroxifenil)-5-hidroxi-heptano-3-O-beta-D-xilopiranosido	<i>Alnus glutinosa</i> <i>Alnus hirsuta</i>	Corteza seca Hojas	Gonzalez-Laredo et al., 1999. Kuroyanagi et al., 2005. Yi-Chun Lai et al., 2012.
	$R_1=H, R_2=OH, R_3=OH, R_4=H$ 7-(3,4-Dihidroxifenil)-1-(4-hidroxifenil)-3(R)-heptanol	<i>Alnus formosana</i>		
	$R_1=H, R_2=OH, R_3=O-Glc, R_4=H$ 7-(3,4-Dihidroxifenil)-1-(4-hidroxifenil)-3(R)-beta-D-glucosiloxi-heptano			
	$R_1=OH, R_2=H, R_3=O-Glc, R_4=H$ 1-(3,4-Dihidroxifenil)-7-(4-hidroxifenil)-3(R)-beta-D-glucosiloxi-heptano			
	$R_1=R_2=OH$ Hirsutenona			
	$R_1=R_2=H$ Platifilenona	<i>Alnus glutinosa</i>	Madera verde	Ohta S., et al., 1984.
	$R_1=H; R_2=OCH_3$ 1-(4-Hidroxifenil)-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4-hepten-3-ona	<i>Alnus hirsuta</i> <i>Alnus japonica</i>	Corteza seca	Fuchino H., et al., 1996. Lee et al., 2002.
	$R=H$ (-)-centrolol	<i>Betula platyphylla</i>	Corteza interior	Ohta S., et al., 1984.
	$R=beta-D-Glcp$ Acerósido VI	<i>Alnus formosana</i>	Hojas	Ohta S., et al., 1985; Nagai M., et al., 1986.

	<p>R=β-D-Apif-(1→6)-β-D-Glcp Acerósido VIII</p> <p>R= β-D-Apif-(1→2)-[β-D-Apif-(1→6)]- β-D-Glcp (3R)-1,7-bis(4-hidroxifenil)-3-heptanol-3-O-[2,6-bis-O-(β-D-apiofuranosil)-β-D-glucopiranosido</p> <p>R=Xil 1,7-Di-(4-hidroxifenil)-3(R)-β-D-xilosiloxi-heptano</p>			<p>Smith E., <i>et al.</i>, 1993.</p> <p>Kim SH, <i>et al.</i>, 2010.</p> <p>Yi-Chun Lai <i>et al.</i>, 2012.</p>
	<p>R₁=R₂=OH, R' = <i>p</i>-cumaroil 2'''-O-<i>p</i>-Cumaroiloregonina</p> <p>R₁=R₂=OH, R' =benzoil 2'''-O-Benzoiloregonina</p> <p>R₁= R₂=OH, R' =2-metilbutanoil 2'''-O-(2-metilbutaniol)-oregonina</p> <p>R₁=R₂=OH, R' =cinamoil 2'''-Cinamoiloregonina</p>	<i>Alnus formosana</i>	<p>Corteza seca</p> <p>Hojas</p>	<p>Ohta S., <i>et al.</i>, 1984.</p> <p>Yi-Chun Lai <i>et al.</i>, 2012.</p> <p>Smith E., <i>et al.</i>, 1993.</p> <p>Lee <i>et al.</i>, 2006.</p>
	Alnustona	<i>Alnus pendula</i>	Flores	Suga <i>et al.</i> , 1972.
	Rhoiptelol B	<i>Alnus hirsuta</i>	Corteza del tallo	Jiang <i>et al.</i> , 1996.
Diarilheptanoides cíclicos				
	Alnusona	<i>Alnus japonica</i>	Madera	Nomura <i>et al.</i> , 1981.
	Alnusolol	<i>Alnus japonica</i>	Flores Madera seca	Nomura <i>et al.</i> , 1981.

	Alnusoxido	<i>Alnus japonica</i>	Madera seca	Nomura <i>et al.</i> , 1981.
	Alnusdiol	<i>Alnus japonica</i>	Madera seca	Nomura <i>et al.</i> , 1981.
	2-Oxatriciclo[13.2.2.13,7]eicosa-3,5,7(20),15,17,18-hexaen-10-16-diol	<i>Alnus hirsuta</i>	Corteza del tallo	Jiang <i>et al.</i> , 2001.
	2-Oxatriciclo[13.2.2.13,7]eicosa-3,5,7(20),15,17,18-hexaen-10-ona	<i>Alnus hirsuta</i>	Corteza del tallo	Moriyama <i>et al.</i> , 1997.
Flavonoides				
	R ₁ =H, R ₂ =OH, R ₃ =Rha Afzelina	<i>Alnus japonica</i>	Hojas	Kuroyanagi <i>et al.</i> , 2005.
	R ₁ =OH, R ₂ =OH, R ₃ =Rha Quercitrina			
	R ₁ =H, R ₂ =OH, R ₃ =Gal Isohiperósido			

4.1.3. Usos tradicionales y medicinales del género *Alnus*

En México, Martín de la Cruz describió el uso medicinal tradicional del “aliso”, llamado antiguamente *quetzalilin*, el cual se utilizaba para tratar diarreas, disentería, estreñimiento, fatiga, para la sanación de una herida y en conjunto con otros materiales y plantas medicinales para la realización de un pronóstico esotérico mágico-religioso para saber si un enfermo moriría o viviría, esto descrito en el libro sobre las hierbas medicinales de los indios (“*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*”, 1552), conocido como códice Badiano¹² (**Figura 1**). En la actualidad en el estado de Chiapas las plantas del género *Alnus* son ampliamente utilizadas dentro de la medicina tradicional por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y para el tratamiento de infecciones venéreas como escrófula, sífilis, condiciones reumáticas e infecciones de la piel¹³.



Figura 1. Descripción del uso medicinal tradicional de *quetzalilin* (aliso) en el códice Badiano¹⁴.

Diferentes especies de *Alnus* son utilizadas en la medicina oriental como febrífugo, hemostático, para tratar heridas causadas por quemaduras, diarrea, para el tratamiento del alcoholismo¹⁵, así como astringente, catártico, emético, galactogogo, antiparasitario, tónico para la piel y como vermífugo¹⁶. Estudios farmacológicos comprueban que los extractos poseen actividad antiinflamatoria, antitumoral, antiobesidad y antioxidante^{17,18,19}.

¹² De la Cruz, M., 1552.

¹³ Martínez *et al.*, 1984.

¹⁴ Martínez *et al.*, 1989.

¹⁵ Park *et al.*, 2010.

¹⁶ Sati *et al.*, 2011.

¹⁷ Jin *et al.*, 2007 (a).

4.1.4. Actividad farmacológica del género *Alnus*

Se ha reportado actividad inhibitoria contra factores inducibles de hipoxia 1 (HIF-1) en la línea celular AGS, células de adenocarcinoma gástrico humano²⁰, actividad antibacteriana contra diversas especies como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, etc.²¹

4.1.5. Relación estructura/actividad de los diarilheptanoides aislados del género *Alnus*

Existen diversas similitudes descritas en la literatura entre la estructura química que presentan los diversos diarilheptanoides y sus actividades biológicas (**Figura 2**):

1. La presencia de un grupo carbonilo en la posición C-3 mejora la actividad citotóxica, conforme a los compuestos probados en la literatura.
2. La presencia de grupos hidroxilo en las posiciones C-3' y C-3'' suprimen la actividad citotóxica de los diarilheptanoides, pero en menor grado que con la ausencia del grupo carbonilo.
3. La presencia de un grupo carbonilo en la posición C-3 y con sustituyentes en C-5 mejora la citotoxicidad en los diarilheptanoides.
4. Los diarilheptanoides glicosilados presentan más altas actividades que sus correspondientes agliconas.

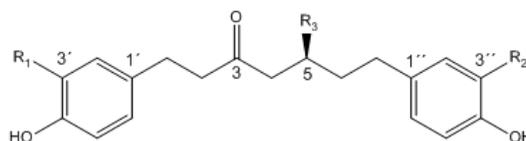


Figura 2. Estructura general de un diarilheptanoide en función a la relación estructura/actividad.

¹⁸ Chung *et al.*, 2006.

¹⁹ Kuroyanagi *et al.*, 2005.

²⁰ Jin *et al.*, 2007 (a).

²¹ Middleton *et al.*, 2005.

4.2. *Alnus acuminata* ssp. *arguta*

Esta especie perteneciente a la familia Betulaceae es un árbol de corteza lisa, delgada y poco arrugada, de color claro a gris oscuro que mide de 15 a 35 metros. El tronco tiene forma cilíndrica u ovalada y presenta diversas ramificaciones alternas, hojas ovaladas de punta aguda, semillas ovaladas con alas y brotes basales²². En la **Figura 3** se observa un árbol característico de la especie *Alnus acuminata* ssp. *arguta*.

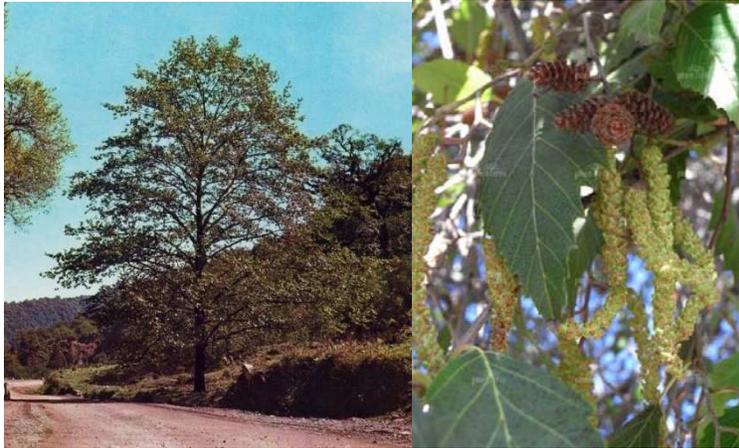


Figura 3. Representación de un árbol característico de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (Schlechtendal) Furlow, con sus hojas, frutos y brotes basales.

4.2.1. Nombres comunes de *A. acuminata* ssp. *arguta*

En diversos estados de México (Chiapas, Yucatán y Veracruz) y países como Argentina, Ecuador y Perú ésta especie recibe diferentes nombres: ilite, aile, alder, abedul, aliso, palo de águila, etc. En otros países de América latina también se le conoce como: palo de lama, ramrám y lambdan (Guatemala), jaúl (Costa Rica); cerezo y chaquiro (Colombia), etc.

²² Álvarez et al., 1956.

4.2.2. Clasificación taxonómica de *A. acuminata* ssp. *arguta*

La clasificación botánica de ésta especie se presenta en la **Tabla 2**²³:

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

Reino	Plantae
Subreino	Thacheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fagales
Familia	Betulaceae
Género	<i>Alnus</i>
Especie	<i>Alnus acuminata</i> (Schlechtendal) Furlow
Subespecie	<i>arguta</i>

4.2.3. Usos medicinales y tradicionales en México de *A. acuminata*

En el estado de Chiapas se utiliza como antiinflamatorio, expectorante, para el tratamiento de la escrófula, enfermedades venéreas, infecciones de la piel, sífilis, reumatismo, etc²⁴.

4.2.4. Distribución geográfica de *A. acuminata* ssp. *arguta*

Es una especie nativa de América central y del sur reside en las altas regiones de montaña, se delimita desde México al norte de Argentina. Crece en asociación con especies de los géneros *Picus*, *Quercus* y *Abies*²⁵.

4.2.5. Actividades farmacológicas de *A. acuminata* ssp. *arguta*

La especie *A. acuminata* y en general el género *Alnus* presentan diversas actividades farmacológicas como antioxidante²⁶ y antiinflamatorio²⁷, inhibición del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), inhibición de la transcriptasa reversa del VIH-1, actividad en procesos estrogénicos (como abortivo), leishmanicidas, actividad relacionada a la melanogénesis, así como efectos hepato y neuroprotectores²⁸.

²³ Información sistemática integral taxonómica, Subcomité de la Casa Blanca Y Ecosistemas Dinámicos, EUA (biblioteca en línea), versión del 29 de febrero de 2016, <http://www.itis.gov>, citado: diciembre, 2015.

²⁴ Martínez, J., 1984.

²⁵ Martínez, J., 1984.

²⁶ Kuroyanagi *et al.*, 2005.

²⁷ Min-Won *et al.*, 2000.

²⁸ Haining *et al.*, 2011.

4.3. Biogénesis de los compuestos seleccionados como marcadores de *A. acuminata*

Los cuatro productos aislados, purificados y caracterizados de la especie *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (**oregonina (I)**, **hirsutanonol (II)**, **platifilonol (III)** y **platifilenona (IV)**) corresponden a compuestos tipo diarilheptanoide, de los cuales la oregonina es el principal compuesto en cuya estructura se encuentra una xilosa y es el compuesto mayoritario de la especie²⁹.

4.3.1. Fenilpropanoides

Son compuestos con estructuras tipo C₆-C₃ que actúan como intermediarios en la biogénesis de una gran diversidad de metabolitos de relevancia biológica y farmacológica, tales como flavonoides, lignanos, taninos, entre otros³⁰. Estos compuestos aromáticos se originan a través de la ruta metabólica del ácido siquímico y de aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina). Presentan un sustituyente alquílico³¹ (**Figura 4**).

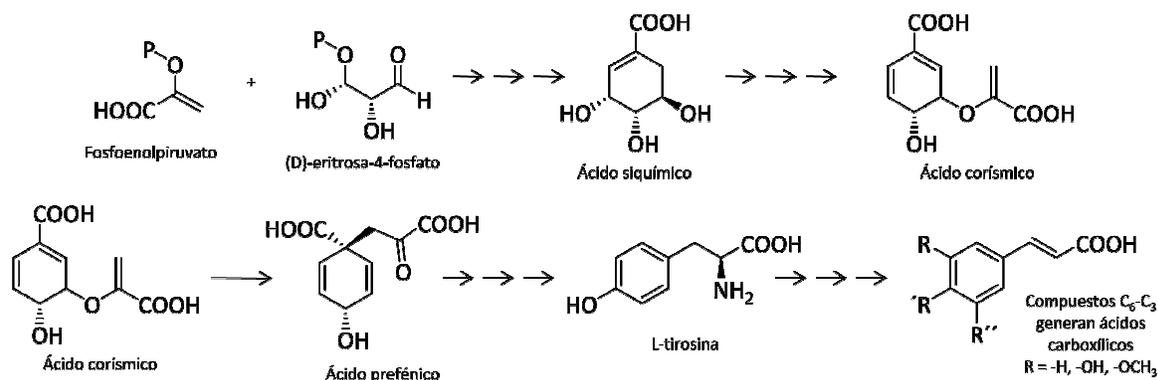


Figura 3. Esquema general de la biogénesis de los compuestos C₆-C₃.

²⁹ Aguilar *et al.*, 2011.

³⁰ Dewick, P.M., Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach, 3ra. Edición, p. 137 (2009).

³¹ Dewick, P.M., Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach, 3ra. Edición, p. 136-149 (2009).

4.3.2. Diarilheptanoides

Son compuestos que contienen un esqueleto 1,7-diarilheptano lineal o cíclico. Son los principales constituyentes del género *Alnus*^{32,33}, encontrándose también en géneros como: *Zingiber*, *Curcuma*, *Alpinia* y *Betula*.

Las actividades farmacológicas reportadas para estos metabolitos secundarios incluyen: actividad antioxidante, antihepatotóxica, actividad inhibitoria de la PKC, antifúngico, antiinflamatoria (vía inhibición de la síntesis de prostaglandinas y sintasa de NO inducible), antiproliferativa, antiemética, quimiopreventiva y con actividad macrófago-antitumoral.

El origen biogénico de estos productos se deriva de la unión de dos bloques de unidades C₆-C₃ que son conectados por un carbono adicional originado de una unidad de malonilCoA, como se describe en la **Figura 5**.

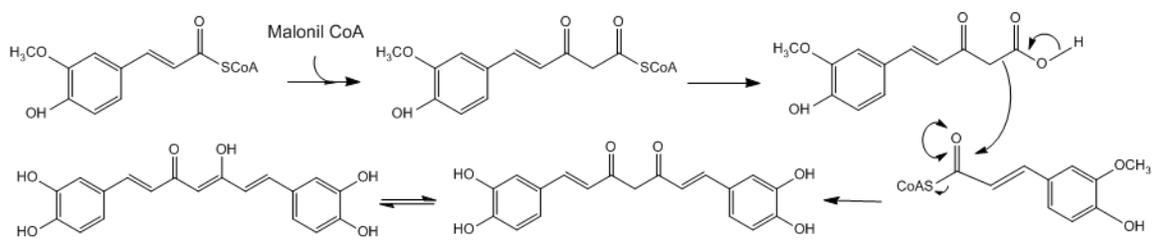


Figura 5. Esquema general de la ruta biogénica de los diarilheptanoides.

³² Brand *et al.*, 2006.

³³ Munde *et al.*, 2013.

4.4. Compuestos marcadores de *A. acuminata* ssp. *arguta*

Los constituyentes mayoritarios aislados de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* que tienen reporte en la bibliografía se enuncian a continuación:

4.4.1. Oregonina

Es el principal diarilheptanoide presente en la corteza del género *Alnus*, en particular de la especie *Alnus acuminata* ssp. *arguta*³⁴, cuya estructura se muestra en la **Figura 6**.

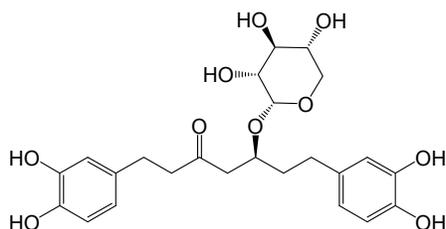


Figura 6. Estructura química del compuesto oregonina.

Las pruebas farmacológicas realizadas en la oregonina han mostrado que este compuesto es un inhibidor significativo de la enzima COX-II^{35,36} en células epiteliales de mama humana, potente inhibidor de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), inhibidor de la sintasa de óxido nítrico en forma dosis-dependiente en macrófagos murinos³⁷, es un mediador de antibiosis, agente con efectos hepatoprotectores y actividad antioxidante, presenta efectos inhibitorios en la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales de vena umbilical humana, inhibe el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) altamente inducido en mecanismos de adhesión de monocitos a células vasculares, suprime la expresión de RNAm de genes de la IL-1 β , asociada a los mecanismos de inflamación³⁸. Actualmente se reporta a la oregonina como un potente antineoplásico, con efectos que suprimen el crecimiento de células con alto potencial proliferativo.

³⁴ Aguilar *et al.*, 2011.

³⁵ Subbaramiah *et al.*, 1996.

³⁶ Lee *et al.*, 2000 (a).

³⁷ Lee *et al.*, 2000 (c).

³⁸ Han *et al.*, 2007.

4.4.2. Hirsutanonol

Presenta diversas actividades farmacológicas: inhibidor significativo de la enzima COX-II en células epiteliales de mama humana³⁹, induce inhibición de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS)⁴⁰, entre otras. La estructura química se observa en la **Figura 7**.

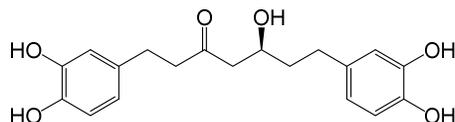


Figura 7. Estructura química del compuesto hirsutanonol.

4.4.3. Hirsutenona

Este diarilheptanoide ha mostrado gran cantidad de actividades biológicas, como: antiinflamatorio, antitumoral y efectos antiatópicos en procesos de dermatitis⁴¹. También, se le han atribuido efectos en el proceso de diferenciación de adipocitos, al suprimir la acumulación de lípidos en el proceso de adipogénesis y con ello presenta efectos antiobesidad⁴². La estructura química se observa en la **Figura 8**.

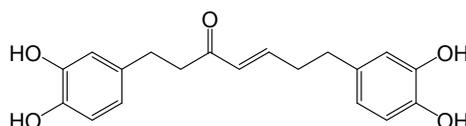


Figura 8. Estructura química del compuesto hirsutenona.

³⁹ Han *et al.*, 2007.

⁴⁰ Lee *et al.*, 2000 (c).

⁴¹ Kim *et al.*, 2006.

⁴² Lee *et al.*, 2013.

En cuanto al platifilonol y platifilenona, éstos han sido probados en diversos ensayos *in-vitro* con modelos de fluido ruminal y en modelos *in-vivo* de liebres, demostrando su capacidad de inhibir la digestión^{43,44,45} y reducción de la palatabilidad⁴⁶. Las estructuras químicas se observan en la **Figura 9**.



Figura 9. Estructura química de los compuestos platifilonol y platifilenona.

⁴³ Sunnerheim-Sjoberg *et al.*, 1988.

⁴⁴ Iason *et al.*, 1991.

⁴⁵ Claeson *et al.*, 1996.

⁴⁶ Sunnerheim-Sjoberg *et al.*, 1988.

4.5. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) ⁴⁷

Es una técnica analítica que permite la separación, distribución y migración de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y una móvil. Estos componentes se separan en la columna (fase estacionaria) por medio de la fase móvil (disolvente) en el orden en que emergieron, de modo que un detector registra una respuesta que es proporcional a la cantidad o concentración de los mismos, así como su tiempo de retención. Esta respuesta analítica se refleja en la forma de picos, los cuales deben ser simétricos con un factor de capacidad característico y similar al de una referencia, lo cual puede llevar a la identificación y cuantificación del compuesto en cuestión.

Los componentes de un equipo de HPLC son:

Sistema de bombeo. Sistema que permite impulsar la fase móvil a través de la columna de forma precisa y reproducible, manteniendo el flujo laminar a velocidad constante.

Sistema de inyección. Este sistema permite la introducción adecuada de la muestra al sistema, por medio de una jeringa de forma manual o a través de un sistema de inyección automático, el cual minimiza errores del volumen inyectado y mantiene la reproducibilidad entre las inyecciones.

Columna. Es la parte del cromatógrafo donde se lleva a cabo la separación de los componentes de una muestra. Dependiendo de su complejidad dependerá el material de empacado y sus dimensiones. Generalmente, se encuentra dentro de un compartimento con un controlador de temperatura para minimizar variaciones y errores.

Detector. Es un equipo que permite detectar propiedades físicas o químicas de uno o varios solutos en una muestra y la fase móvil del sistema. La señal emitida del detector es posteriormente registrada por un graficador o integrador electrónico, el cual traduce las señales ópticas en eléctricas, y éstas a su vez en numéricas para la medición y determinación de picos cromatográficos y sus áreas.

⁴⁷ FEUM, 2014.

4.6. Validación de métodos analíticos⁴⁸

Es la evidencia documental que provee un alto grado de seguridad de que un proceso o método analítico se comporta consistentemente y cumple con las características de desempeño conforme a los objetivos con que fue establecido. Los métodos analíticos establecidos para evaluar la calidad de diferentes productos farmacéuticos deben estar sujetos a las normatividades vigentes, tanto nacionales como internacionales. En México, a través de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) se establecen las especificaciones de los métodos analíticos, los cuales previamente deben ser validados.

El proceso de validación de métodos analíticos de la FEUM y USP se divide en cuatro categorías:

- **Categoría I.** Incluye métodos analíticos que permiten cuantificar un componente particular en una muestra de producto terminado o en prueba de estabilidad de fármacos, aditivos y/o preparados farmacéuticos.
- **Categoría II.** Métodos analíticos destinados a la determinación de impurezas (determinaciones cuantitativas) en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y/o aditivos.
- **Categoría III.** Engloba los métodos analíticos utilizados en la determinación de una muestra para la evaluación de una característica de desempeño de un preparado farmacéutico.
- **Categoría IV.** Permite realizar pruebas de identificación de un analito en diferentes muestras de fármaco, preparados farmacéuticos, etc., destinados a establecer la presencia del analito de interés.

⁴⁸ FEUM, 2014; USP, 37.

4.7. Inflamación

Es la principal respuesta fisiológica del cuerpo con el fin de mitigar lesiones, heridas o procesos patológicos, manifestados por medio de síntomas como hinchazón, enrojecimiento, dolor y fiebre (tumor, rubor, dolor y calor)⁴⁹. Este fenómeno contribuye a la activación de mecanismo de reparación y homeostasis mediante diversos procesos de señalización química que implican la activación y migración de leucocitos (neutrófilos, monocitos y eosinófilos) al sitio de inflamación para liberar sustancias mediadoras de la inflamación (interleucinas, factor de necrosis tumoral, etc.) y especies reactivas que permiten eliminar las células dañadas a través de procesos apoptóticos.

En los diferentes procesos de inflamación, la participación de la enzima ciclooxigenasa (COX) es muy importante. Se localiza de forma integral en las proteínas membranales del retículo endoplásmico y la membrana nuclear⁵⁰ y su principal función es catalizar el paso limitante del metabolismo del ácido araquidónico (AA), en el cual se adicionan 2 equivalentes de oxígeno molecular para la formación de un endoperóxido inestable (prostaglandina G₂ o PGG₂), el cual por sucesivas reacciones de peroxidación cataliza la conversión de PGG₂ en PGH₂, blanco principal para la síntesis de prostanoïdes específicos y la producción de prostaglandinas pro-inflamatorias (PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF₂, etc.), prostaciclina y tromboxanos (TXA₂)^{51,52} (**Figura 10**). Esta enzima presenta dos isoformas COX-I y COX-II, cuya expresión y actividad depende del sitio donde se localizan y los factores por los cuales son estimulados. La isoforma constitutiva COX-I está ligada a la producción fisiológica de prostaglandinas y al mantenimiento de la homeostasis renal y gástrica⁵³, y la isoforma COX-II es estimulada por la presencia de citocinas, ésteres de forbol (como el TPA), lipopolisacáridos, factores de crecimiento⁵⁴ y por lesiones.

⁴⁹ Larsen *et al.*, 1983.

⁵⁰ Spencer *et al.*, 1998.

⁵¹ Smith *et al.*, 1991.

⁵² Vane *et al.*, 1971.

⁵³ Seibert *et al.*, 1994 (a).

⁵⁴ Seibert *et al.*, 1994 (b).

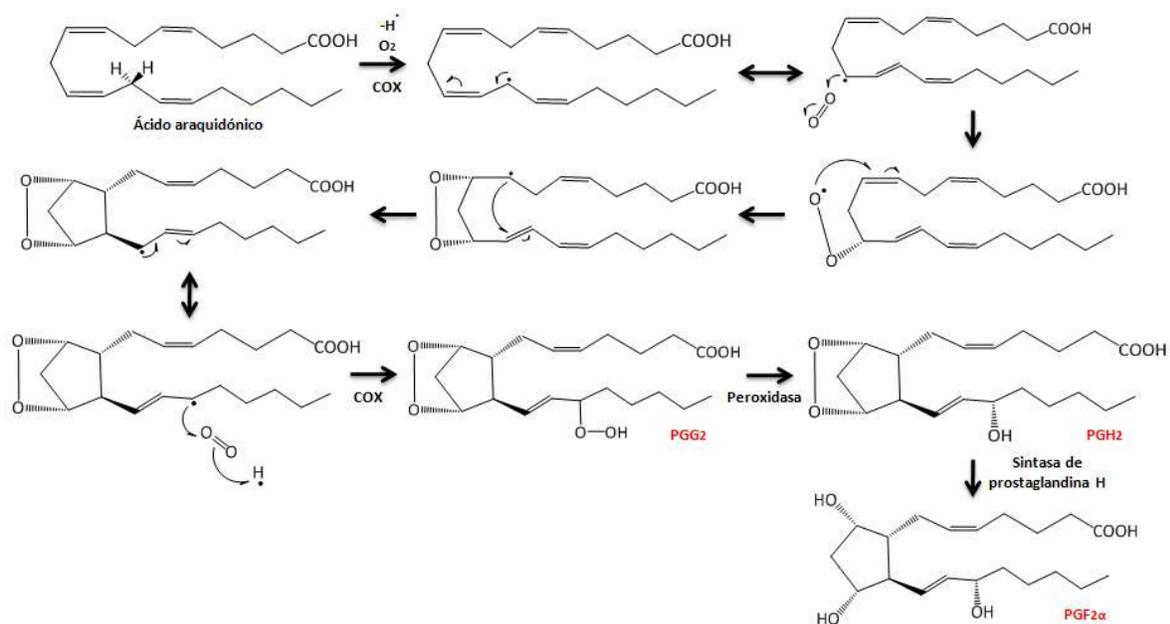


Figura 10. Esquema general de la biogénesis de la prostaglandina $PGF_{2\alpha}$ a partir de ácido araquidónico (AA)⁵⁵.

4.7.1. Ensayo *in-vitro* de actividad antiinflamatoria mediante la enzima COX-II

Este ensayo permite la determinación del potencial y selectividad de inhibidores de la actividad enzimática de COX (en su isoforma COX-I o COX-II) mediante la detección indirecta de $PGF_{2\alpha}$ como producto de la función catalítica peroxidasa sobre las prostaglandinas (PG) para determinar la CI_{50} de los compuestos que inhiben selectivamente a COX-I (obtenida de las vesículas seminales de ovejas) o a COX-II (enzima recombinante humana). La detección se realiza a través de un método inmunoensayístico.

⁵⁵ Dewick, P.M., Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach, 3ra. Edición, p. 60 (2009).

4.7.2. Ensayo *in-vivo* mediante un modelo de inflamación de oreja de ratón inducido con TPA.

Es un modelo que permite la evaluación del efecto de compuestos antiinflamatorios tópicos potenciales o extractos botánicos que tengan efecto sobre la respuesta inflamatoria generada en tejidos (oreja de ratón) por la aplicación tópica de agentes como el TPA (13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol)⁵⁶, el cual tiene un efecto en los productos del metabolismo del ácido araquidónico (AA) como PGI₂ y LTB₄, compuestos que inhiben a las enzimas COX y LOX, estimulando la proliferación celular y migración de células PMN (polimorfonucleares) a los tejidos dañados para generar mediadores de la inflamación como eicosanoides, TNF- α , interleucinas, etc., así como el incremento en la producción de leucotrienos y prostaglandinas⁵⁷ y la producción de especies reactivas de oxígeno en el proceso de inflamación⁵⁸. Esta técnica depende de la capacidad antiinflamatoria e inhibitoria de los intermediarios de la inflamación de los compuestos y extractos probados, efectos reflejados en la disminución del peso del edema de la oreja de ratón para determinar el porcentaje de inhibición (% de inhibición).

⁵⁶ Gabor *et al.*, 2003.

⁵⁷ Fischer *et al.*, 1988.

⁵⁸ Hara *et al.*, 1992.

5. HIPÓTESIS

Si se comprueba que el desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) es adecuado para detectar y resolver la mezcla de compuestos mayoritarios presentes en la corteza y madera de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*, entonces es posible cuantificar su contenido en los extractos con actividad antiinflamatoria.

6. JUSTIFICACIÓN

Ante la demanda cada vez mayor de productos utilizados en la medicina tradicional mexicana, es de gran importancia garantizar el acceso a la población de productos fitoterápicos de calidad, eficaces y seguros, lo cual representa una alternativa en la medicina tradicional para mantener, prevenir o tratar las enfermedades de mayor incidencia en las poblaciones mexicanas. Por esta razón, es necesaria la incorporación de nuevas monografías en la farmacopea herbolaria mexicana que permitan llevar a cabo el control de calidad de la droga para comprobar su inocuidad, calidad y eficacia de los eventuales productos fitoterapéuticos al momento de ser fabricados, expendidos y comercializados. Con el presente estudio se pretende complementar la información científica existente para la creación e incorporación de la monografía de la planta medicinal *Alnus acuminata* ssp. *arguta* en la FHEUM.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Desarrollar y validar un método analítico por HPLC para cuantificar los compuestos mayoritarios presentes en la planta medicinal *Alnus acuminata* ssp. *arguta*, realizando la determinación comparativa del contenido metabólico de la corteza y de la madera como drogas vegetales utilizadas en la medicina tradicional mexicana.

7.2. Objetivos particulares

- Realizar el aislamiento, purificación e identificación de los compuestos mayoritarios de la corteza y de la madera de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*.
- Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC comprobando los siguientes parámetros requeridos para la validación del sistema y del método, empleando los compuestos **I**, **II**, **III** y **IV** del material vegetal.
 - Adecuabilidad del sistema.
 - Precisión y linealidad del sistema.
 - Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC).
 - Linealidad y exactitud del método.
 - Repetibilidad.
 - Precisión del método (precisión intermedia).
- Realizar la cuantificación de los compuestos mayoritarios (**I**, **II**, **III** y **IV**) contenidos en la corteza y en la madera de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* a partir de los extractos de MeOH.
- Realizar un análisis comparativo del contenido metabólico de **I**, **II**, **III** y **IV** en la corteza y en la madera de la especie vegetal.
- Evaluar la estabilidad analítica de los compuestos marcadores en distintas condiciones de almacenaje y temperatura.
- Determinar la capacidad antiinflamatoria de los extractos acuosos (infusiones) de la corteza y de la mezcla de corteza y madera mediante un modelo *in-vitro* de inhibición de enzima ciclooxigenasa (COX-II) y un modelo *in-vivo* de inflamación de oreja de ratón inducido por TPA.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. Desarrollo del método analítico por HPLC

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos marca Waters (Waters Corporation Milford MA, USA) modelo 515 equipado con un detector UV-VIS marca Waters modelo 2487 con dos canales, dos bombas isocráticas marca Waters modelo 515 y 510 respectivamente; un controlador de temperatura marca Waters; un controlador automático de gradiente marca Waters modelo 680 y un equipo de cómputo que contiene el software Waters Milenium. La respuesta analítica a evaluar durante el desarrollo del método analítico fue el registro del área bajo la curva (ABC), y las condiciones cromatográficas desarrolladas para la validación del método analítico y para la cuantificación de los compuestos mayoritarios puros y en los extractos de metanol se describen en la **Tabla 3**, así como las condiciones analíticas de tipo preparativo para la purificación de los diarilheptanoides.

Tabla 3. Condiciones analíticas para la obtención de los compuestos mayoritarios por cromatografía de líquidos preparativa y para la realización del método de validación y cuantificación por HPLC.

Condiciones de tipo preparativo para la purificación de metabolitos	Condiciones de tipo analítico para la cuantificación de metabolitos
<p>Columna preparativa XBridge™, fase reversa C₁₈, tamaño de partícula 5 μm, de dimensiones 19 x 50 mm.</p> <p>Inyección manual.</p> <p>Modo de elución: Gradiente (%): t₀: 98(A):2(B), t₃: 65(A):35(B), t_{3.5}: 63(A):37(B), t₄: 62(A):38(B), t_{4.5}: 61(A):39(B), t₅: 60(A):40(B), t₆: 57(A):43(B), t₈: 98(A):2(B).</p> <p>Fase móvil: [Agua Milli Q](A)/[Acetonitrilo](B)</p> <p>Flujo: 10 mL/min. λ=278 nm; T=28°C.</p> <p>Volumen de inyección: 20, 50, 100 y 200 μL.</p>	<p>Columna analítica Symmetry™, fase reversa C₁₈, tamaño de partícula 5 μm, de dimensiones 250 x 4.6 mm.</p> <p>Inyector automatizado marca JASCO.</p> <p>Modo de elución: Gradiente (%): T₀₋₅: 98(A):2(B), t₆: 90(A):10(B), t_{11.30-12.00}: 56(A):44(B), t₁₃: 55(A):45(B), t₁₄: 54(A):46(B), t₁₅: 38(A):62(B), t₁₇: 15(A):85(B), t₂₁: 98(A):2(B).</p> <p>Fase móvil: Agua Milli Q (A)/Acetonitrilo (B)</p> <p>Flujo: 0.65 mL/min. λ=278 nm; T=28°C.</p> <p>Volumen de inyección: 20 μL.</p>

8.2. Caracterización de los productos naturales

La elucidación de la estructura química de los productos naturales se realizó mediante la obtención de espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , en sus modalidades HSQC, HMBC, COSY y NOESY, realizados en equipos Varian Innova de 400 MHz (USAI) y 500 MHz (Instituto de Química, UNAM). Se utilizaron como disolventes deuterados CD_3OD y CDCl_3 , y los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS), utilizado como estándar interno.

8.3. Obtención de productos naturales de la corteza de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*

8.3.1. Material Vegetal

La corteza de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* se recolectó en el pueblo de Huistán, Chiapas. La identificación botánica fue realizada por el Dr. M. Ishiki Ishihara (Ishiki-324), y una muestra de referencia fue depositada en el Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Chiapas. El material vegetal fue proporcionado por el Dr. Andrés Navarrete Castro.

Para el uso adecuado de la corteza, ésta se sometió a un proceso de desecación a temperatura ambiente bajo sombra, siendo posteriormente fragmentada en un molino de cuchillas marca Thomas-Wiley núm. 4; se utilizó como tamiz una malla de 5 mm de diámetro.

8.3.2. Preparación de extractos totales (orgánicos y acuosos)

1.16 kg de corteza y madera de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* fue sometido a un método de maceración con 5.5 L de hexano en una columna de vidrio abierta de 12x85 cm por 72 h hasta obtener el extracto de hexano (5.25 g). El material vegetal desgrasado se extrajo por percolación empleando la misma columna con una mezcla de CH_2Cl_2 :MeOH (1:1) por un periodo de dos semanas, haciendo cambios de mezcla cada tres días, para la obtención del extracto total. El producto de extracción fue llevado a sequedad empleando una bomba de alto vacío, y se obtuvieron 36.33 g de extracto total crudo.

8.3.3. Fraccionamiento por reparto del extracto total

El extracto orgánico total obtenido se suspendió en 500 mL de agua desionizada tibia hasta obtener una suspensión de color amarillo-café, la cual se sometió a extracciones sucesivas por reparto realizadas con AcOEt y 1-BuOH (ver **Figura 11**).

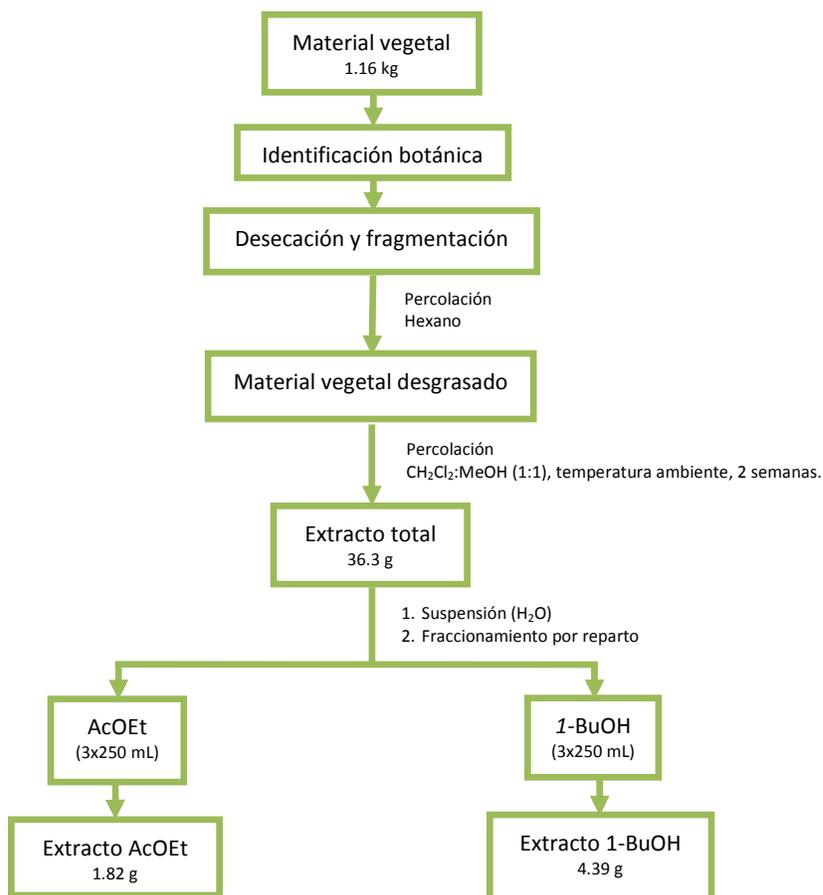


Figura 11. Diagrama general del fraccionamiento de la materia vegetal para la obtención de extractos de AcOEt y 1-BuOH.

8.3.3.1. Análisis cromatográfico por UPLC/MS del extracto de AcOEt

Se llevó a cabo el análisis por Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Eficiencia acoplado a Espectrometría de Masas para la obtención del perfil cromatográfico del extracto de AcOEt con el fin de corroborar la presencia de los compuestos oregonina (I) y el hirsutanonol (II) en el extracto de AcOEt. Los análisis para la obtención de los cromatogramas y espectros de masas se realizaron en una columna ACQUITY UHPLC BEH, fase reversa C₁₈, tamaño de partícula 1.7 µm, de dimensiones: 2.1 x 100 mm; el volumen de inyección en los tres casos fue de 3 µL previamente filtrados con un prefiltro de 0.45 micras; la elución se realizó utilizando las condiciones mencionadas; el método de ionización fue por Electrospray negativo (ESI⁻) por mecanismo de protonación empleando las siguientes condiciones: temperatura de la cámara de ionización: 100 °C; voltaje del capilar: 3.00 kV; analizador: tiempo de vuelo; detección de iones positivos; resolución de 30000 y fase móvil compuesta por Agua:MeCN (gradiente lineal).

Los análisis se realizaron por el personal técnico de la USAI.

8.3.3.2. Aislamiento de los diarilheptanoides I y IV a partir del extracto de AcOEt

El extracto de AcOEt (1.82 g) obtenido se sometió a un proceso de fraccionamiento utilizando cromatografía en columna abierta (CCA) de Sephadex LH-20 (50 g) y empleando como fase móvil MeOH. Este proceso generó 21 fracciones de aproximadamente 100 mL cada una, separadas de acuerdo al color con el que progresaba la elución: rojo, amarillo y verde. Éstas fueron finalmente agrupadas en 9 fracciones de acuerdo con su similitud cromatográfica en CCF, de modo que al realizar una CCF con estándares de I y IV se determinó que la fracción FIV (619.8 mg) contenía los metabolitos de tipo diarilheptanoide de interés, por lo que ésta fue sometida a un fraccionamiento secundario en CCA con 1 g de gel de sílice, utilizando un gradiente de CHCl_3 :MeOH con incrementos de polaridad (1:0 \rightarrow 0:1). De este tratamiento se obtuvieron 36 eluatos de 3 mL, los cuales fueron agrupados en 14 fracciones, de las cuales a la fracción FX (83 mg) se le realizó un nuevo fraccionamiento en CCA con 3.2 g de gel de sílice utilizando un gradiente de CHCl_3 :MeOH con polaridad creciente, obteniendo así 23 fracciones que, de acuerdo a su similitud en CCF fueron agrupadas en 11 fracciones, en cuyo caso, la fracción FVII (65.9 mg) fue de interés, al contener dos compuestos mayoritarios que fueron separados mediante cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP) de gel de sílice con una mezcla de CHCl_3 :MeOH (8:2), lo cual condujo al aislamiento de los diarilheptanoides oregonina (I) y platifilenona (IV) (**Figura 12**). El rendimiento del compuesto IV mejoró al reunirse con los metabolitos aislados del extracto de 1-BuOH, bajo el esquema de trabajo planteado en el **Apartado 8.3.3.4**.

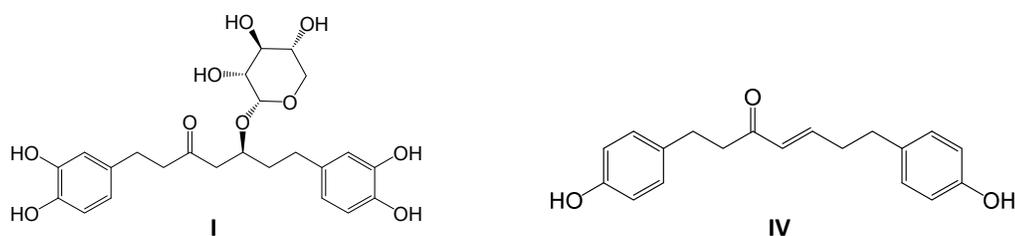


Figura 12. Estructura química de los compuestos I y IV obtenidos del extracto de AcOEt.

Las estructuras de los compuestos I y IV se comprobaron mediante el análisis espectroscópico (^1H -RMN, ^{13}C -RMN y sus modalidades bidimensionales COSY, HSQC, HMBC y NOESY) (**Anexo I, Espectros 1-14, 37-47**).

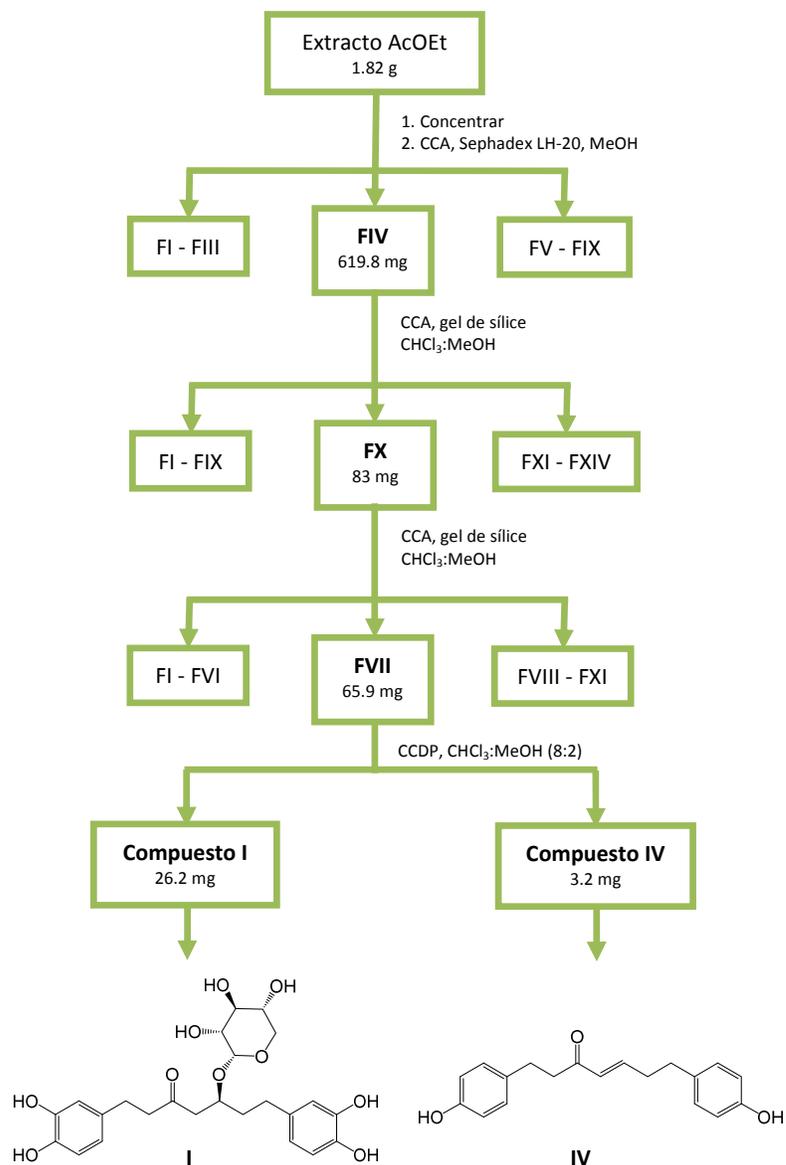


Figura 13. Diagrama del fraccionamiento cromatográfico del extracto de AcOEt.

8.3.3.3. Aislamiento de los diarilheptanoides II, III y IV a partir del extracto de 1-BuOH

El extracto de 1-BuOH (4.39 g) obtenido del extracto total fue sometido a un fraccionamiento en CCA de Sephadex LH-20 (50 g) con MeOH como eluyente. Este proceso generó 23 fracciones de aproximadamente 25 mL cada una, separadas de acuerdo con el color progresivo de la elución: rojo, amarillo, café y ámbar. Éstas a su vez fueron agrupadas en 7 fracciones (fracciones A–G') de acuerdo a su similitud cromatográfica en CCF, de modo que al realizar una CCF los estándares de **II** y **IV** se determinó que la fracción FC' (1.4703 g) contenía mayoritariamente los diarilheptanoides de interés. Esta fracción fue sometida a un fraccionamiento secundario en CCA con 28.6 g de gel de sílice, utilizando un gradiente de CHCl₃:MeOH con incrementos de polaridad (1:0 → 0:1). De este tratamiento se obtuvieron 160 eluatos, los cuales fueron agrupados en 12 fracciones, de las cuales a las fracciones FIX (185.1 mg) y FX (227.4 mg) se les realizó un nuevo fraccionamiento en CCA con gel de sílice utilizando el mismo gradiente de CHCl₃:MeOH con polaridad creciente hasta obtener lo siguiente: (1) en el caso de la fracción FIX se obtuvieron 217 fracciones, las cuales de acuerdo a su similitud en CCF fueron agrupadas en 26 fracciones, en cuyo caso las fracciones FIX-FXVI (87.8 mg totales), identificadas posteriormente como FI'', fueron sometidas a una CCDP de gel de sílice con una mezcla de CHCl₃:MeOH (8:2). Lo anterior condujo al aislamiento de **IV**; (2) para la fracción FX se obtuvieron 184 fracciones, las cuales de acuerdo a su similitud cromatográfica fueron agrupadas en 20 fracciones, de las cuales la fracción FXVII aislada (185.1 mg) se dividió en dos porciones para su posterior tratamiento: una primera porción de 120 mg fue sometida a una CCDP de gel de sílice con una mezcla CHCl₃:MeOH (7:3) para la obtención de 2 fracciones (C-I y C-II). La fracción C-I (71.5 mg) se sometió a un nuevo fraccionamiento por CCDP de gel de sílice con las mismas condiciones de fase móvil hasta la nueva obtención de 2 fracciones (C-A y C-B), con lo cual se condujo al aislamiento del compuesto **IV** (**platifilenona**), aumentando así el rendimiento del mismo; en cuanto a la segunda porción de 60 mg de la fracción FXVII se sometió a un proceso de purificación por CLAE en condiciones preparativas, realizando la optimización del método hasta obtener un mayor rendimiento con base en la resolución del pico cromatográfico de interés mediante los siguientes volúmenes de inyección: 20, 50, 100 y 200 µL. Este procedimiento condujo al aislamiento del compuesto **II** (**hirsutanonol**) y del compuesto **III** (**platifilonol**) como se observa en las **Figuras 14** y **15**. Las condiciones de análisis por CLAE en condiciones preparativas se visualizan en la **Tabla 3**.

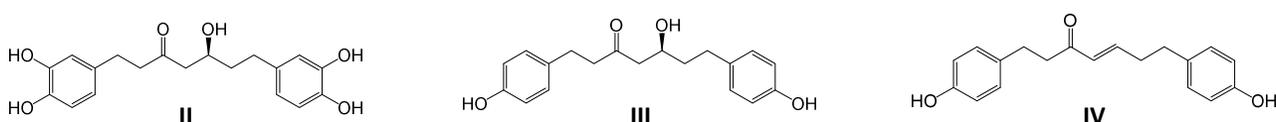


Figura 14. Estructura química de los compuestos **II**, **III** y **IV** obtenidos del extracto de 1-BuOH.

Las estructuras de los compuestos **II**, **III** y **IV** se determinaron mediante el análisis espectroscópico (¹H-RMN, ¹³C-RMN y sus modalidades COSY, HSQC, HMBC y NOESY) (**Anexo I, Espectros 15-25, 26-36, 37-47**).

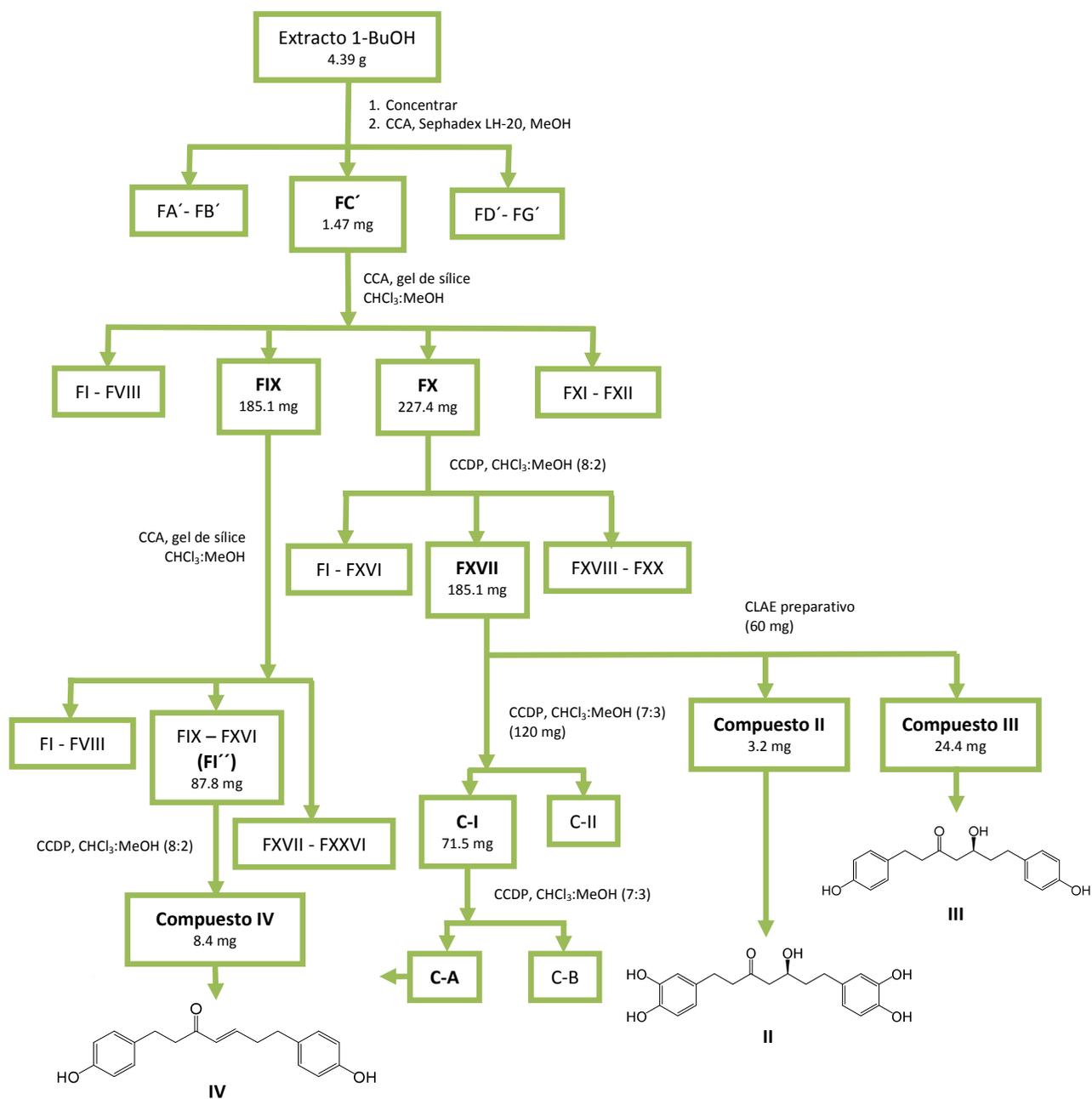


Figura 15. Diagrama del fraccionamiento cromatográfico del extracto de 1-BuOH.

8.3.3.4. Obtención del hirsutanonol (II) mediante reacción general de hidrólisis ácida

Para la obtención de mayor rendimiento del compuesto II, 100 mg del compuesto I (previamente aislado en el laboratorio, por el equipo de trabajo) se sometieron a un proceso de hidrólisis ácida mediante el siguiente procedimiento: se adicionaron 5 mL de HCl (10% v/v) al compuesto I y la mezcla se calentó en un baño de agua a 80°C durante dos horas. Posteriormente se dejó enfriar la mezcla de reacción y se neutralizó con una solución saturada de NaHCO₃. La extracción de la aglicona de oregonina (I) correspondiente al hirsutanonol (II) se realizó mediante un fraccionamiento por reparto con AcOEt (3 x 2 mL), secando la fase orgánica con Na₂SO₄ y se concentró al vacío.

La identidad del hirsutanonol (I) se corroboró mediante una CCF, utilizando como referencia 1 mg del compuesto II aislado en el apartado anterior, para posteriormente determinar su estructura mediante el análisis espectroscópico por ¹H-RMN, ¹³C-RMN y sus modalidades COSY, HSQC, HMBC y NOESY (**Anexo I**).

8.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

8.4.1. Pruebas preliminares para la validación del método por HPLC

Los diarilheptanoides mayoritarios presentes en los extractos de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (I, II, III y IV) han sido reportados con anterioridad en la bibliografía⁵⁹, y se emplearon como compuestos marcadores en este trabajo. En la literatura se describen sus propiedades espectroscópicas (absorción en UV), lo que sugiere que es posible cuantificarlos por HPLC.

Las condiciones cromatográficas se determinaron de forma experimental, inyectando una mezcla de los compuestos marcadores de la especie puros, encontrando las condiciones óptimas de trabajo, corroborando su presencia en los extractos de MeOH al ser coinyectados posteriormente. Esto se observa en las Figuras 16, 17 y 18.

El contenido metabólico de los extractos de MeOH de la corteza y de la mezcla de corteza y madera de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* se resolvió con las condiciones planteadas (Tabla 3), como se observa en las Figuras 16 y 17.

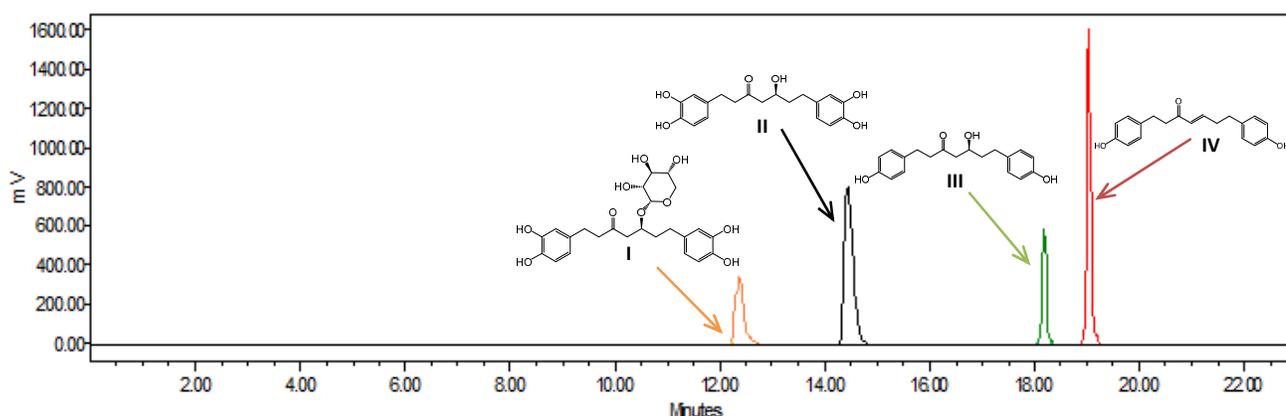


Figura 16. Cromatograma de la mezcla de los cuatro compuestos marcadores: oregonina (I), hirsutanonol (II), platifilonol (III) y platifilonona (IV).

⁵⁹ Aguilar et al., 2011.

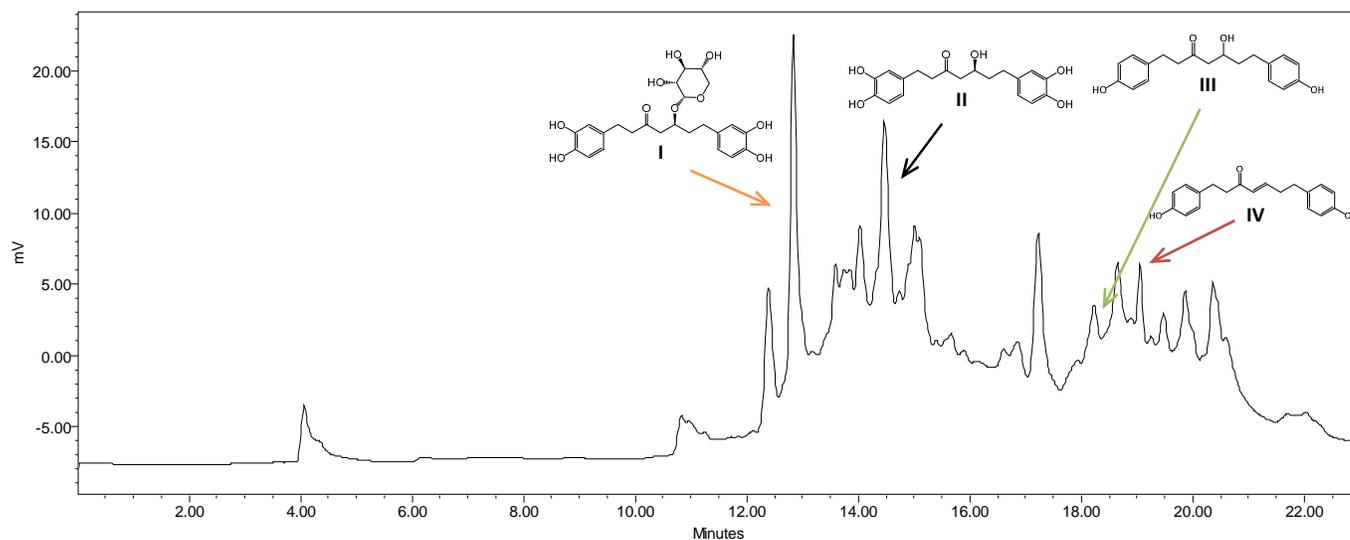


Figura 17. Cromatograma del extracto de MeOH de la corteza y de la madera de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*. Identificación de: oregonina (I), hirsutanonol (II), platifilonol (III) y platifilenona (IV).

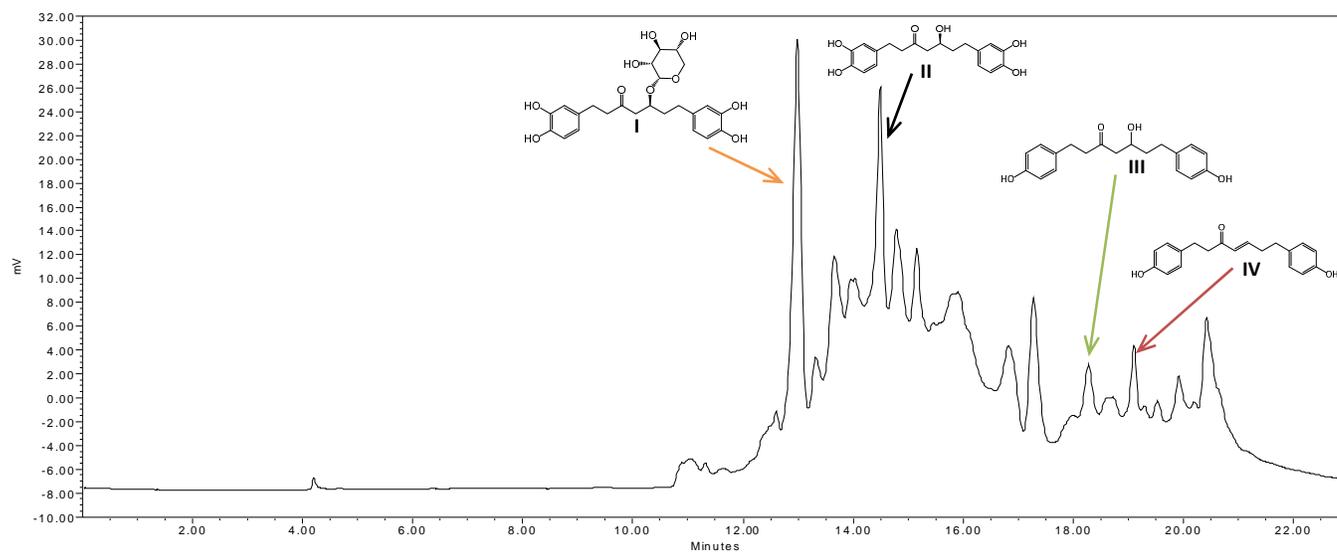


Figura 18. Cromatograma del extracto de MeOH de la corteza de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*. Identificación de: oregonina (I), hirsutanonol (II), platifilonol (III) y platifilenona (IV).

La presencia de los compuestos marcadores se demostró comparando sus tiempos de retención con los de los compuestos contenidos en el extracto de MeOH, así como con la inyección de los extractos de MeOH de la corteza y de la madera enriquecidos con cada compuesto puro, como se muestra en las Figuras 19 y 20.

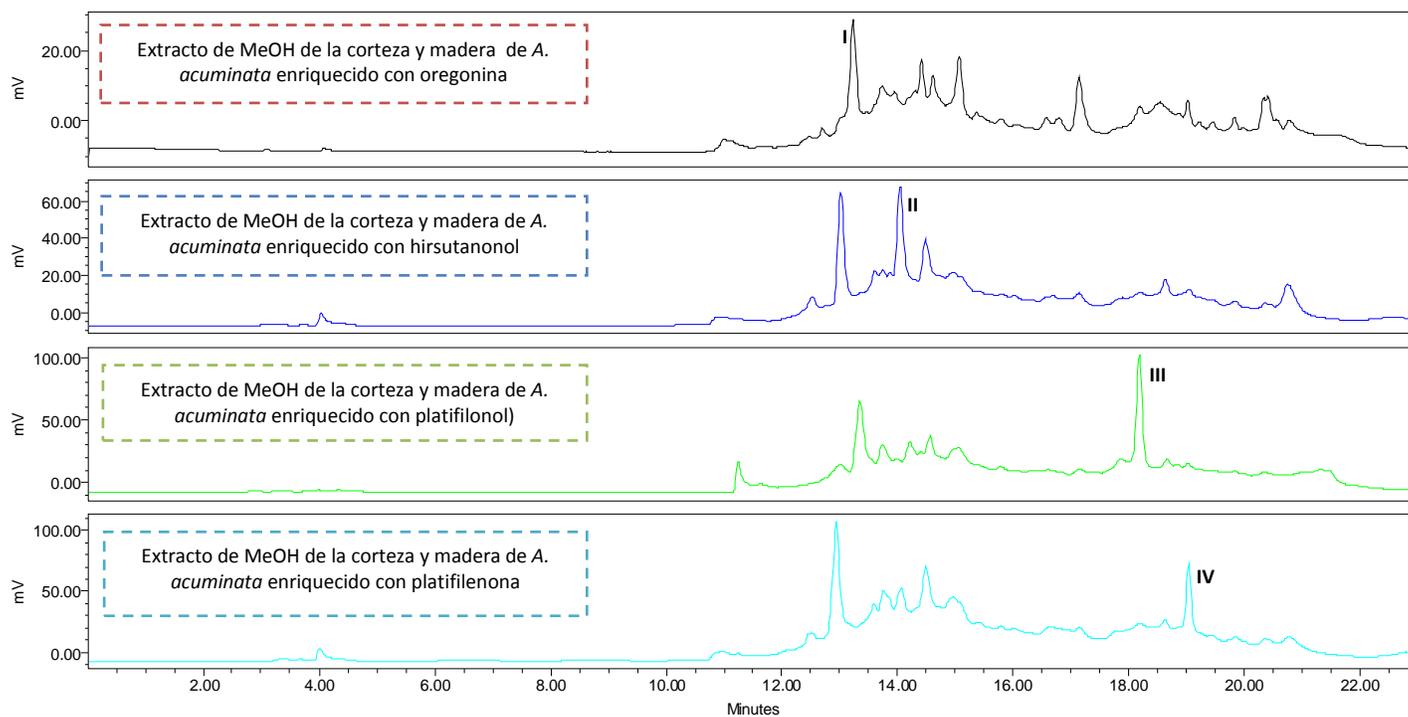


Figura 19. Cromatogramas del extracto de MeOH de la corteza y de la madera de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* enriquecidos con: oregonina (I), hirsutanonol (II), platifilonol (III) y platifilenona (IV).

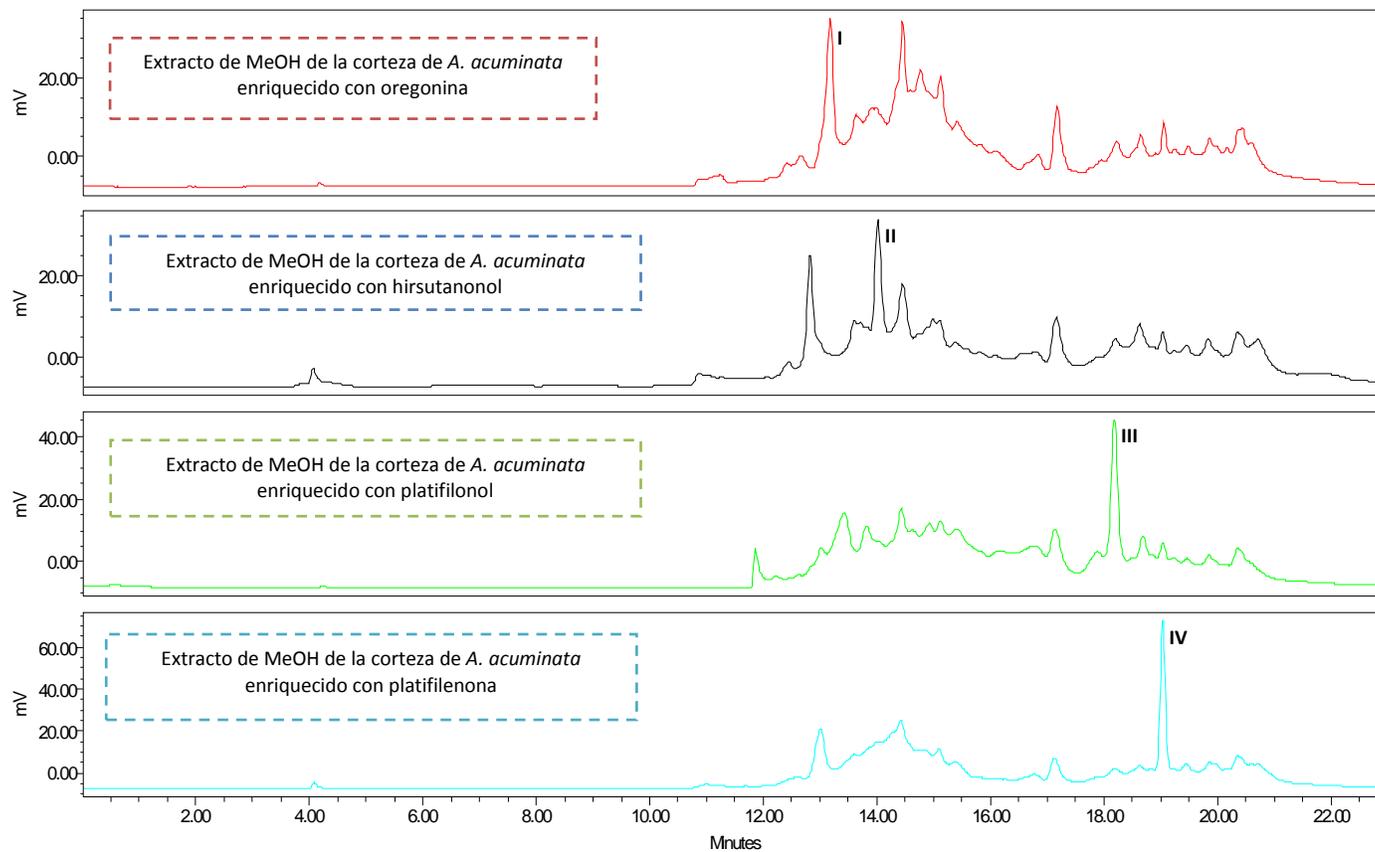


Figura 20. Cromatograma del extracto de MeOH de la corteza de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* enriquecidos con oregonina (I), hirsutanonol (II), platifilonol (III) y platifilenona (IV).

8.4.2. Método de extracción para la cuantificación por HPLC

8.4.2.1. Preparación de la matriz de trabajo

Se utilizó ultrasonido como método de extracción de la matriz de trabajo. Para ello se pesaron con precisión y exactitud 500 mg de la corteza y madera y 30 mg de corteza previamente secos, fragmentados y tamizados. El material vegetal fue transferido a tubos de centrifuga (15 mL), se adicionaron 3 mL de MeOH y se sometió a extracción con ultrasonido durante 30 min; posteriormente se centrifugaron los tubos a 3500 rpm durante 15 min. Se tomó una cantidad apropiada de muestra, se filtró con acrodiscos de 0.45 μm , y se inyectó al cromatógrafo.

8.4.2.2. Determinación de los rangos de trabajo para cada compuesto marcador

Los rangos de concentraciones de trabajo se determinaron con base en la altura promedio de los picos cromatográficos obtenidos de la respuesta de cada compuesto en los extractos. Por esta razón se prepararon soluciones de cada compuesto puro con concentraciones conocidas y se comparó su altura con la de los picos correspondientes a cada compuesto en los cromatogramas de los extractos de prueba. La concentración de cada metabolito en el extracto se calculó por comparación con su estándar en cuanto a sus respuestas cromatográficas, considerando así la concentración de cada compuesto como un 100% o *concentración de trabajo*. Los datos obtenidos se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Determinación de las concentraciones de trabajo para cada compuesto marcador.

Compuesto	Longitud de onda (nm)	Altura promedio del pico en el extracto de la corteza + madera (μV)	Altura del pico a concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (μV)	Concentración de los estándares en el extracto de la corteza + madera ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
oregonina (I)	278	35272	42231	208.8
hirsutanonol (II)	278	9871	33037	78.7
platifilonol (III)	278	28811	57424	125.4
platifilenona (IV)	278	6513	271678	6.0

Los valores obtenidos de concentraciones al 100% respecto al extracto de MeOH de la corteza externa y de la madera para los compuestos fueron: 200 (I), 80 (II), 120 (III), y 10 (IV) $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

8.4.2.3. Preparación de las soluciones stock

Se prepararon de forma independiente cuatro soluciones stock, correspondientes a cada uno de los compuestos puros, con una concentración equivalente al 1500% de la concentración de trabajo (**stock A**), de la cual, se preparó una segunda solución (**stock B**), para ajustar los volúmenes hasta obtener una concentración final equivalente al 300% de las concentraciones de trabajo. De esta manera, la solución **stock B** comprende el punto más alto de concentraciones que se emplearán en la validación del sistema, evaluando así concentraciones correspondientes al 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 y 300% con respecto a la solución de trabajo. En la **Figura 21** se representa el plan de trabajo que se desarrolló.

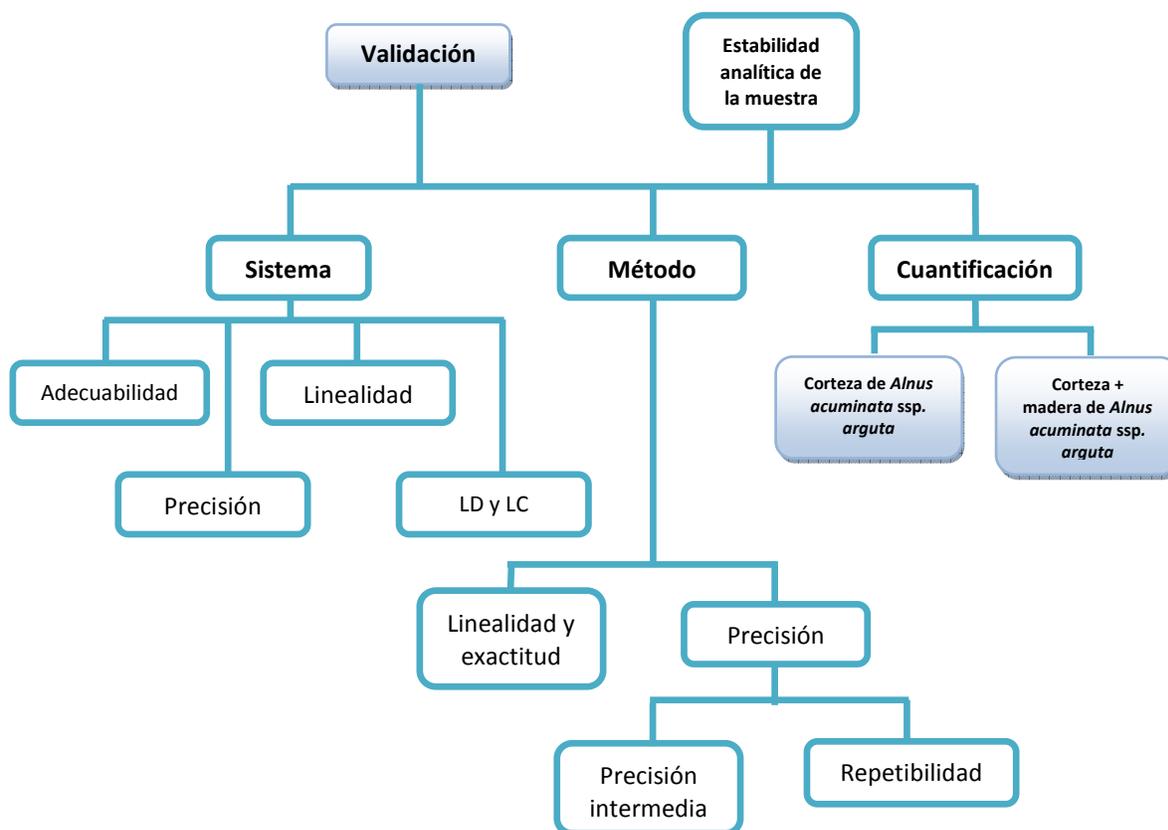


Figura 21. Diagrama general para el desarrollo de la validación del método analítico por HPLC para la cuantificación de los compuestos marcadores de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*.

8.4.3. VALIDACIÓN DEL SISTEMA POR HPLC

8.4.3.1. Adecuabilidad del sistema

A partir de la solución **stock B** se prepararon soluciones a concentraciones equivalentes al 100% de la cantidad de cada compuesto marcador estimada en el extracto de MeOH de la corteza y de la madera de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*. De la respuesta de cada compuesto se calculó el %CV, cuyo criterio de aceptación es $\%CV \leq 2.0\%$, así como debe de cumplir con los parámetros de desempeño descritos en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Parámetros cromatográficos para la adecuabilidad del sistema.

Parámetro	Límite
Tiempo de retención	-
Tiempo muerto	-
Factor de capacidad k'	>2
Factor de coleo	<2
Número de platos teóricos	>2000

8.4.3.2. Precisión del sistema

Se prepararon por sextuplicado y por diluciones independientes a partir de la solución **stock B** soluciones de cada compuesto mayoritario a una concentración del 100%, se determinó la respuesta analítica de cada compuesto para así calcular la media aritmética, desviación estándar y %CV, cuyo criterio de aceptación es ser $\leq 2.0\%$.

8.4.3.3. Linealidad del sistema

Partiendo de la solución **stock B**, se prepararon soluciones equivalentes a siete niveles de concentración por triplicado y por diluciones independientes, correspondientes a concentraciones del 12.5, 25, 50, 100, 150 y 300% respecto a las estimadas de cada compuesto en el extracto de MeOH, representando así tres concentraciones superiores y tres concentraciones inferiores a la concentración de trabajo estipuladas. Una vez obtenida la respuesta analítica se calcularon los siguientes parámetros: las pendientes (b_1), las ordenadas al origen (b_0), los coeficientes de determinación (r^2), los coeficientes de correlación lineal (r), el intervalo de confianza para la ordenada al origen [$IC(\beta_0)$] y el intervalo de confianza para la pendiente [$IC(\beta_1)$]. Los criterios de aceptación son: $r^2 \geq 0.98$, $r \geq 0.999$, el $IC(\beta_0)$ debe incluir al cero y el $IC(\beta_1)$ debe ser diferente de cero.

8.4.3.4. Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC)

A partir de la solución **stock B** se prepararon soluciones por triplicado evaluando niveles de concentración por debajo de los empleados para determinar la linealidad del sistema, esto con la finalidad de determinar la concentración más baja en la que los compuestos mayoritarios son detectados y cuantificados de manera precisa con base en el cálculo del %CV entre ellos, cuyo criterio de aceptación es ser $\leq 2.0\%$.

8.4.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO POR HPLC

8.4.4.1. Linealidad y exactitud del método

La evaluación de la linealidad y exactitud del método se realizó con la matriz vegetal de trabajo empleada en el **Apartado 8.4.2.1.**, la cual consistió del extracto de MeOH de la corteza y del extracto de MeOH de la mezcla de corteza y madera de *Alnus acuminata ssp. arguta*, a la cual se le adicionaron tres diferentes niveles de concentraciones relativas de la solución **stock B** equivalentes al 50%, 100% y 150% de las concentraciones de trabajo, por triplicado y por mediciones independientes. Estas muestras fueron inyectadas en el CL, registrando así la respuesta analítica e interpolando los resultados en la curva de calibración lineal del *sistema*, obteniendo así las concentraciones experimentales para cada inyección. Partiendo de estos datos se calcularon los porcentajes de recobro de las muestras, los coeficientes de determinación (r^2), los coeficientes de correlación lineal (r), las pendientes (b_1), las ordenadas al origen (b_0), los intervalos de confianza para las ordenadas al origen [$IC(\beta_0)$], los intervalos de confianza para las pendientes [$IC(\beta_1)$], las medias poblacionales (\bar{y}), las desviaciones estándar (S), los coeficientes de variación de las regresiones ($CV_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la media poblacional ($IC_{(\mu)}$). Los criterios de aceptación para la linealidad del método son: $r^2 \geq 0.98$, $r \geq 0.999$, el $IC(\beta_0)$ debe incluir el cero, el $IC(\beta_1)$ debe ser diferente de cero; y para la exactitud del método son: el $\%CV_{y/x} \leq 2.0\%$ y el $IC_{(\mu)}$ debe incluir el valor 100.

8.4.4.2. Precisión del método

Este parámetro se evaluó mediante la *Repetibilidad y Precisión intermedia*.

8.4.4.3. Repetibilidad

Se realizó mediante la metodología descrita en el apartado de *Linealidad del método*, evaluando por sextuplicado cada muestra de la matriz de trabajo adicionadas con las cantidades de los compuestos mayoritarios necesarios para obtener las concentraciones relativas al 100% para cada compuesto. Partiendo de las respuestas analíticas, se calcularon los porcentajes de recobro para cada muestra, las medias aritméticas (\bar{y}), las desviaciones estándar (S), los coeficientes de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional ($IC_{(\mu)}$) del porcentaje de recobro. Los criterios de aceptación son: $\%CV \leq 2.0\%$ y el $IC_{(\mu)}$ incluye el valor de 100%.

8.4.4.4. Precisión intermedia o tolerancia interdía/analista

La precisión intermedia se realizó analizando por triplicado una muestra homogénea en un nivel equivalente al 100% de la concentración de trabajo, en dos días y por dos analistas, usando la misma solución de referencia, así como los instrumentos y equipos. A partir de las respuestas analíticas se calcularon: las medias aritméticas (\bar{y}), las desviaciones estándar (S) y los coeficientes de variación (CV). El criterio de aceptación es $\%CV \leq 2.0\%$.

8.4.5. Estabilidad analítica de la muestra

La estabilidad analítica de las muestras se realizó con muestras independientes a partir de una muestra homogénea, realizando el análisis por triplicado y de forma simultánea para cada una de las siguientes condiciones:

- ✓ Temperatura ambiente en presencia de luz.
- ✓ Temperatura ambiente en ausencia de luz.
- ✓ A 4°C en presencia de luz.
- ✓ A 4°C en ausencia de luz.
- ✓ A 37°C en ausencia de luz.

Los resultados se reportaron en los intervalos de tiempo: 0, 24, 72 horas y 8 días. De las respuestas obtenidas se calculó: las medias aritméticas de análisis inicial (\bar{y}_0), las medias aritméticas para cada condición de almacenaje (\bar{y}_1) y la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial ($|d_i|$). El criterio de aceptación es $|d_i| \leq 2.0\%$.

8.4.6. Cuantificación de los compuestos mayoritarios en *Alnus acuminata ssp. arguta*

Para realizar la cuantificación de los metabolitos mayoritarios se empleó el método descrito en el apartado de **Preparación de la matriz de trabajo (Apartado 8.3.2.)**. La respuesta analítica se obtuvo en el cromatograma de los extractos de MeOH de únicamente la corteza y de la mezcla de corteza y madera de la especie vegetal, la cual se interpoló en la curva de calibración obtenida en la *Linealidad del sistema*. Partiendo de la ecuación de la regresión lineal se calculó la concentración de cada compuesto mayoritario en ambos componentes de *Alnus acuminata ssp. arguta*.

8.5. Pruebas de actividad antiinflamatoria

Se evaluaron dos extractos provenientes de la infusión de la corteza y de la mezcla de corteza y madera de *Alnus acuminata ssp. arguta* mediante un inmunoensayo espectrofotométrico *in-vitro* con la enzima COX-II de forma preliminar y un ensayo *in-vivo* mediante un modelo de inflamación de oreja de ratón inducido con TPA.

8.5.1. Ensayo *in-vitro* de actividad antiinflamatoria mediante la enzima COX-II

Este ensayo se realizó en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química, UNAM, con la colaboración del M. en C. Antonio Nieto Camacho y el M. en C. Gonzalo Lara Isassi. Se utilizó un kit de visualización de inhibición de enzima COX-II (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), siguiendo el protocolo del fabricante y la información reportada en la literatura⁶⁰. Ésta técnica se realizó adicionando una cantidad de grupo Heme con enzimas COX-II a un tubo de ensayo con buffer de reacción de COX-II (0.1 M de HCl-Tris (pH = 8), 5 mM de EDTA y 2 mM de fenol). Estos reactivos se mezclaron por 10 minutos a una temperatura de 37°C, utilizando como control positivo y como inhibidor selectivo de la isoforma COX-II el Celecoxib. Subsecuentemente, una solución de ácido araquidónico (AA) se adicionó a la mezcla anterior para iniciar la reacción de la COX-II, se incubó por 2 minutos a 37°C y se adicionó HCl 1M para finalizar la reacción enzimática, llevándose a cabo la reducción de la prostaglandina PGH₂ en PGF_{2α} por medio de una solución saturada de SnCl₂ por 5 minutos a temperatura ambiente. La actividad inhibitoria de COX-II se determinó mediante la cuantificación de prostaglandinas PGF_{2α}, las cuales reaccionaron inmunoenzimáticamente por su capacidad de unión a anticuerpos IgG (de suero de conejo) acoplados a una enzima acetilcolinesterasa, la cual sucesivamente reacciona con acetilcolina en el medio para hidrolizarla en tiocolina, especie que reacciona con un compuesto orgánico (5,5'-ditio-*bis*-(2-ácido benzoico)) para generar el ácido 5-tio-nitrobenzoico, compuesto de coloración amarilla que se determinó por espectrofotometría a $\lambda = 412$ nm.

⁶⁰ Mitchell *et al.*, 1993.

8.5.2. Ensayo *in-vivo* mediante un modelo de inflamación de oreja de ratón inducido con TPA

Este ensayo de inducción de edema en oreja de rata se realizó en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química, UNAM, mediante la colaboración del M. en C. Antonio Nieto Camacho. Se siguió la metodología descrita en la literatura⁶¹, utilizando un grupo de 5 ratones macho CD-1 (25-30g) previamente anestesiados con Imalgen®, a los cuales se les aplica tópicamente en ambos lados de la oreja derecha 20 µL de una solución con agua:acetona (1:1) de TPA (0.25 mg/mL) por 10 minutos, aplicando como control negativo acetona en ambos lados de la oreja izquierda. Después de 2 horas, se realiza la aplicación de los productos de prueba a tres orejas con el fin de evaluar su capacidad antiinflamatoria por dos horas. Posteriormente, se sacrifica a los ratones para extraer ambas orejas y se determina su peso para evaluar el porcentaje de inhibición mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{Inhibición} = (C_r - C_t) / C_r * 100$$

donde C_r representa el peso de la oreja tratada sólo con TPA y C_t representa el peso de la oreja tratada anteriormente con TPA y aplicación de los productos de prueba.

El ensayo *in-vivo* se realizó con los materiales y condiciones que se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Material y condiciones para el ensayo *in-vivo* de inducción de edema de oreja por TPA.

Material y condiciones
Cepa ratones: CD-1.
Control: TPA (acetato de tetradecanoilforbol)
Vehículo: agua:acetona (1:1)
Dosis aplicada en cada oreja: 1 mol/oreja, 1 µmol/oreja
Volumen aplicado en cada oreja: 20 µL

⁶¹ Della *et al.*, 1994.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación se enfocó en el aislamiento, la identificación y la cuantificación de los principales compuestos marcadores de *Alnus acuminata ssp. arguta*, planta de amplio uso en la medicina tradicional de México. Los resultados generados en este trabajo se resumen a continuación: en primer lugar se realizó un estudio preliminar por el método de UPLC/MS con el fin de corroborar la presencia de los diarilheptanoides oregonina (I) e hirsutanonol (II) en el extracto de AcOEt para su posterior proceso de separación y purificación, teniendo como antecedente que en trabajos anteriores fue complicada la separación de ambos productos al tener considerables similitudes cromatográficas y estructurales. Posterior a esto y teniendo como antecedente esta dificultad, se optimizó el proceso de aislamiento y purificación por métodos cromatográficos y mediante el uso de HPLC tipo preparativo hasta la obtención de cuatro diarilheptanoides (I, II, III y IV) a partir del extracto de AcOEt y de 1-BuOH; su estructura se corroboró mediante el análisis de los espectros correspondientes de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, así como el análisis de las correlaciones en los espectros bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC y NOESY). Los resultados se compararon con las constantes espectroscópicas y el valor del índice de rotación óptica (por la presencia de carbonos estereogénicos en tres diarilheptanoides) reportadas en la literatura para corroborar inequívocamente la estructura de los compuestos. Las propiedades espectroscópicas (absorción en UV) de los compuestos mencionados permitieron el desarrollo y validación de un método analítico, el cual comprendió el establecimiento de parámetros como: linealidad del sistema y del método, límites de detección y cuantificación, así como de la precisión (repetibilidad y precisión intermedia), entre otros, para establecer una metodología analítica confiable y apropiada para realizar la cuantificación de los compuestos marcadores en los componentes de la planta vegetal (corteza y madera) como prueba de control de calidad para un eventual manejo racional de la droga en la medicina tradicional. Finalmente, dado el uso tradicional del vegetal en estudio, se utilizaron dos modelos biológicos de actividad antiinflamatoria con los extractos acuosos (infusiones) de ambos componentes de la planta: un modelo *in-vitro* para determinar la capacidad de inhibición de la enzima COX-II por una reacción inmunoenzimática, y un modelo de inflamación *in-vivo* en oreja de rata inducido por TPA.

9.1. Análisis cromatográfico por UPLC/MS

El análisis por el método de UPLC/MS procesado en el extracto de AcOEt (**Figura 11**) permitió corroborar la presencia de los compuestos oregonina (**I**) y de hirsutanonol (**II**), metabolitos cuya separación por métodos cromatográficos en trabajos anteriores fue complicada, como se mencionó en un párrafo anterior, al tener factores de retención similares al momento de ser procesados en HPLC, a pesar de que se trataba de la aglicona (**II**) y de su glicósido (**I**). La evidencia de la presencia de ambos compuestos en el extracto se muestra en el cromatograma de la **Figura 22**. Este experimento permitió optimizar las metodologías de separación y cuantificación.

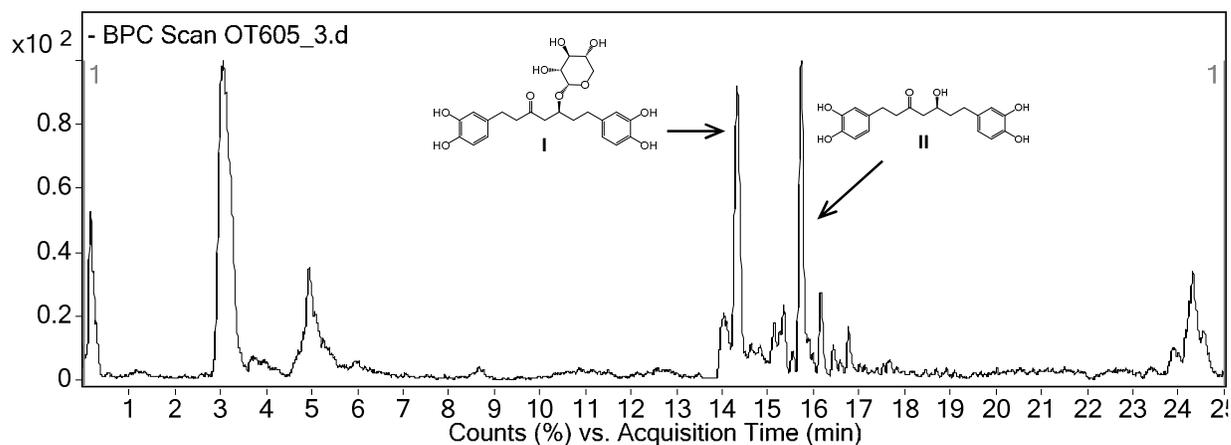


Figura 22. Cromatograma obtenido por el análisis de UPLC/MS del extracto de AcOEt de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*. Identificación de oregonina (**I**) e hirsutanonol (**II**).

El análisis por UPLC/MS del extracto de AcOEt mostró varios picos correspondientes a metabolitos de tipo diarilheptanoide de acuerdo a su peso molecular y patrones de fragmentación observados. En el cromatograma de líquidos (**Figura 22**), entre los 14.264 -14.534 minutos se observó la presencia de un pico con $m/z = 477$ $[M-H]^-$ correspondiente al peso molecular M-1 de la oregonina (**I**) (PM = 478) (**Figura 23**), en el cual se observa un fragmento con $m/z = 345$ (correspondiente al peso molecular de la aglicona) que refleja la pérdida de un fragmento con $m/z = 102$ correspondiente al grupo xilosa del diarilheptanoide (para generar el pico base del espectro, correspondiente al hirsutanonol (**II**)), como se observa en la **Figura 25**.

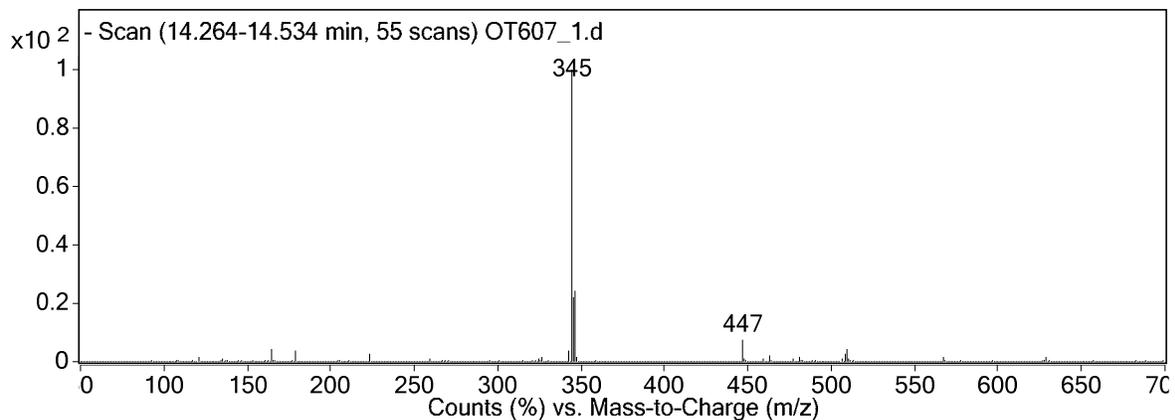


Figura 23. Espectro de masas correspondiente a la oregonina por la técnica ESI⁻.

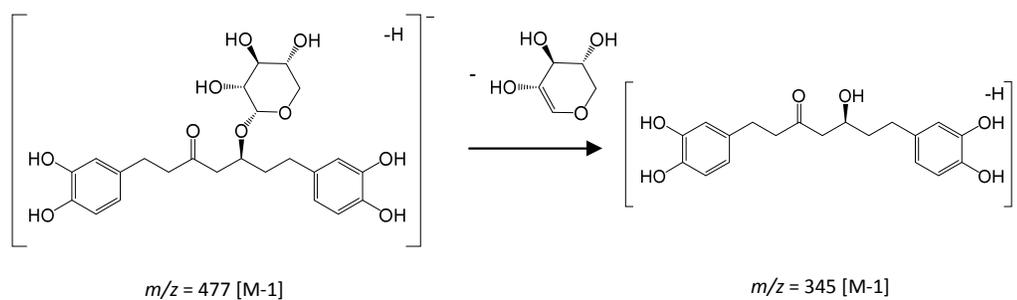


Figura 24. Patrón de fragmentación de la oregonina (I) por la técnica ESI⁻.

En el segundo espectro de masas obtenido (**Figura 25**), entre los 15.622 -15.841 minutos se confirmó la presencia de compuesto con un peso del ión molecular de $m/z = 345$ $[M-H]^-$ correspondiente al peso molecular M-1 del hirsutanonol (**II**) (PM = 346), de la cual se observa un fragmento molecular de $m/z = 165$, lo cual refleja la pérdida de un fragmento de $m/z = 180$ como se muestra en el patrón de fragmentación de la **Figura 26**.

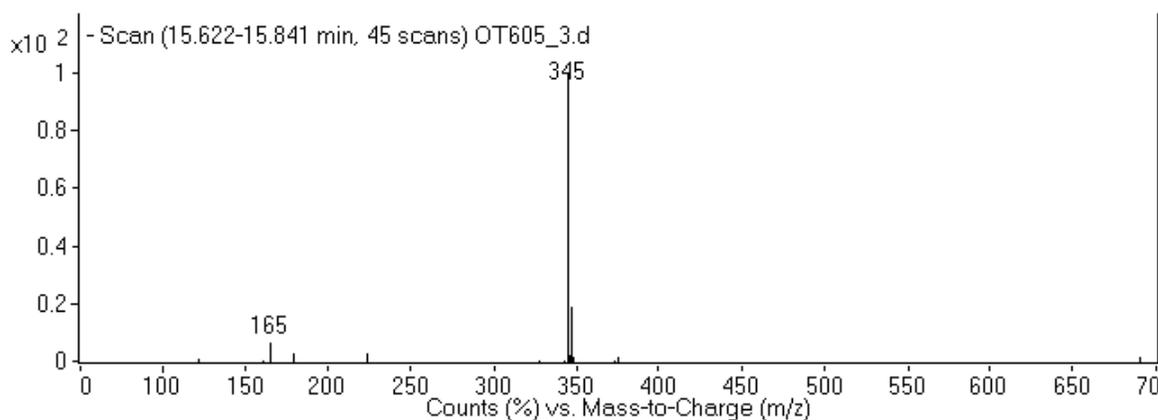


Figura 25. Espectro de masas correspondiente al hirsutanonol $[M-H]^-$ por la técnica ESI⁻.

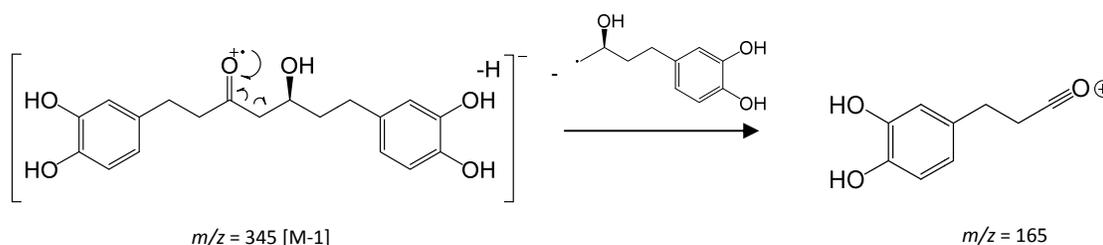


Figura 26. Patrón de fragmentación para el hirsutanonol (**II**) por la técnica ESI⁻.

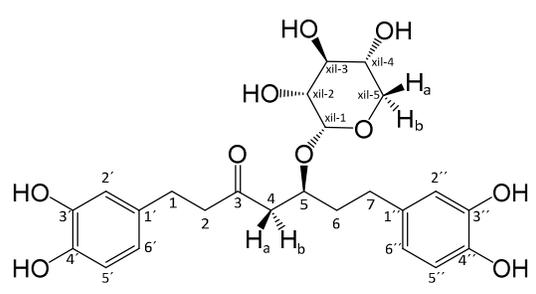
Estos resultados permitieron corroborar la presencia de ambos diarilheptanoides en el extracto de AcOEt, con lo cual fue factible la realización de diversos fraccionamientos cromatográficos para la obtención de los compuestos marcadores.

9.2. AISLAMIENTO Y CONFIRMACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS

9.2.1. Aislamiento de (5S)-1,7-bis-(3,4-dihidroxifenil)-heptan-5-O-β-D-xilopiranosido (oregonina) [I]

En el subfraccionamiento de la **fracción VII (Figura 12)** obtenido del extracto de AcOEt se detectó un compuesto amorfo color café cuya identidad correspondió al compuesto **I**, siendo corroborado por: CCD con el R_f correspondiente al de un estándar de oregonina aislado en trabajos previos, así como por el tiempo de retención que se registró en las eluciones por HPLC (12.43 min, ver **Apartado 8.4.3.1., Adecuabilidad del Sistema**) con correspondencia también al tiempo de retención del estándar **I**, y finalmente mediante las características espectroscópicas que se muestran en la **Tabla 7** y en el **Anexo I**, así como por el análisis comparativo de las constantes espectroscópicas y el índice de rotación óptica reportados en la literatura⁶².

Tabla 7. Datos espectroscópicos de la oregonina (**I**).

Datos	
Fórmula	$C_{24}H_{30}O_{10}$ (PM = 478)
Estructura	
Rotación óptica teórica	$[\alpha]_D^{20} = -17.5^\circ$ ($c=1.0$, Me_2CO)
Rotación óptica experimental	$[\alpha]_D^{20} = -0.012^\circ$ ($c=0.5$, Me_2CO)
¹ H RMN	400 MHz, CD_3OD , δ : 6.64 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), δ : 6.64 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5''), δ : 6.61 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), δ : 6.60 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2''), δ : 6.48 (1H, dd, $J = 7.9, 2.0$ Hz, H-6'), δ : 6.47 (1H, dd, $J = 7.9, 2.0$ Hz, H-6''), δ : 4.21 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-xil-1), δ : 4.11 (1H, dd, $J = 7.3, 6.0$ Hz, H-xil-2), δ : 4.08 (1H, dd, $J = 9.9, 6.0$ Hz, H _a -xil-5), δ : 3.84 (1H, dd, $J = 8.1, 7.4$ Hz, H _b -xil-5), δ : 3.48 (1H, t, $J = 8.9$ Hz, H-xil-3), δ : 3.46 (1H, ddd, $J = 10.4, 9.0, 5.6$, H-xil-4), δ : 3.13 (1H, qui, $J = 6.6$ Hz, H-5), δ : 2.80 (2H, d, $J = 6.9$ Hz, H-1), δ : 2.76 (2H, d, $J = 6.9$ Hz, H-2), δ : 2.71 (1H, dd, $J = 15.2, 5.2$ Hz, H _a -4), δ : 2.70 (1H, ddd, $J = 12.0, 7.8, 4.4$ Hz, H-7), δ : 2.70 (1H, ddd, $J = 12.0, 7.4, 3.5$ Hz, H-7), δ : 2.58 (1H, dd, $J = 15.2, 5.2$ Hz, H _b -4), δ : 2.50 (1H, m, H-6), δ : 2.45 (1H, m, H-6).

⁶² Eun-Kyung *et al.*, 2015.

¹³C RMN

100 MHz, CD₃OD, δ: 211.8 (C-3), δ: 146.1 (C-3'), δ: 146.1 (C-3''), δ: 144.4 (C-4'), δ: 144.2 (C-4''), δ: 135.1 (C-1'), δ: 134.0 (C-1''), δ: 120.7 (C-6'), δ: 120.6 (C-6''), δ: 116.6 (C-5'), δ: 116.5 (C-5''), δ: 116.4 (C-2'), δ: 116.3 (C-2''), δ: 104.3 (C-xil-1), δ: 77.9 (C-5), δ: 76.3 (C-xil-3), δ: 75.1 (C-xil-2), δ: 71.3 (C-xil-4), δ: 67.0 (C-xil-5), δ: 48.5 (C-4), δ: 46.5 (C-2), δ: 38.6 (C-6), δ: 31.8 (C-7), δ: 30.1 (C-1).

La estructura de la oregonina (I) se corroboró por correlaciones diagnósticas propias de los diarilheptanoides en los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN y en los experimentos bidimensionales, así como con la información de la literatura⁶³: en el espectro de ¹³C-RMN se observaron 24 señales correspondientes a todos los carbonos: seis carbonos protonados correspondientes a la cadena heptanoide (corroborado por el experimento HSQC); seis carbonos aromáticos correspondientes a doce señales empalmadas; seis carbonos unidos a oxígeno, señales características del carbonilo en C-3 y del carbono base de oxígeno C-5 unido al azúcar xilosa, éste último de acuerdo a las correlaciones observadas en los espectros HSQC y HMBC. En el espectro de ¹H-RMN en la región de hidrógenos alifáticos se ubican los cinco metilenos de la cadena alifática; se observan dos pares de sistemas ABX en la región de hidrógenos aromáticos, esto por las señales en el espectro centradas en 6.64 (dos dobletes empalmados con $J = 8.0$ Hz, H-5' y H-5''), en 6.61 dos dobletes *quasi* empalmados con $J = 2.0, 2.1$ Hz, H-2' y H-2'') y 6.48 (dos dobles de dobles con $J = 7.9, 2.1$ Hz, H-6' y H-6''). Cabe resaltar que estas últimas señales integran para dos hidrógenos cada una. Con esto se comprueba que una cadena 1,7-diaril alifática se encuentra unida a un 3,4-dihidroxifenilo. Esta posición de los dos grupos fenilos se determinó acorde a las características de correlación en el espectro HMBC entre los protones H-2' con C-1, y H-2'' con C-7. Por otra parte, el hidrógeno H-7 muestra correlación con C-5 y los carbonos del grupo catecol C-2'', C-6'', y C-1''. También, se observan correlaciones de H-2'' con C-7, C-6'', y C-4''; mientras que H-6'' con C-7, C-2'', y C-4''. Respecto al residuo de la pentosa xilosa se observa un metileno y cuatro metinos base de oxígeno en la zona de 67.0 a 104.3, donde el hidrógeno H-xil-1 correlaciona con C-5; H-5 con el carbono anomérico C-xil-1 y C-3. El signo de la rotación óptica experimental del compuesto I coincidió con el reportado en la literatura^{64,65} (ver **Tabla 7**).

⁶³ Kuroyanagi *et al.*, 2005.

⁶⁴ Park *et al.*, 2010.

⁶⁵ Kuroyanagi *et al.*, 2005.

9.2.2. Aislamiento y obtención de (5S)-1,7-bis-(3,4-dihidroxifenil)-heptan-5-ol (hirsutanonol) por hidrólisis ácida [II].

La purificación por HPLC tipo preparativo de la **fracción FXVII (Figura 14)** del extracto de 1-BuOH dio como resultado un compuesto que fue idéntico cromatográfica y espectroscópicamente al producto de hidrólisis ácida realizada sobre el compuesto oregonina (I) aislado previamente. Éste presentó consistencia semisólida de color café oscuro, cuya identidad correspondió al compuesto **II** (hirsutanonol), siendo corroborado tanto por el R_f en CCD y por el tiempo de retención en HPLC (13.65 min., ver **Apartado 8.4.3.1, Adecuabilidad del Sistema**) de II, los cuales correspondieron con el de un estándar de hirsutanonol (II) aislado en trabajos previos, así como por el análisis de las características espectroscópicas que se muestran en la **Tabla 8** y en el **Anexo I**, y por la comparación del valor y signo del índice de rotación óptica reportados en la literatura⁶⁶.

Tabla 8. Datos espectroscópicos del hirsutanonol (II).

Datos	
Fórmula molecular	C₁₉H₂₂O₆ (PM = 346 g mol⁻¹)
Estructura	
Rotación óptica teórica	$[\alpha]_D^{20} -15.5^\circ$ ($c=1.0$, Me ₂ CO)
Rotación óptica experimental	$[\alpha]_D^{20} = -0.001^\circ$ ($c=0.5$, Me ₂ CO)
¹H RMN	<p>400 MHz, CD₃OD, δ: 6.68 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), δ: 6.67 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5''), δ: 6.64 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), δ: 6.63 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2''), δ: 6.52 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, H-6'), δ: 6.51 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, H-6''), δ: 4.03 (1H, m, H-5), δ: 2.74 (2H, t, $J = 2.2$ Hz, H-1), δ: 2.73 (2H, dd, $J = 3.3$ Hz, H-2), δ: 2.60 (1H, dd, $J = 17.8, 7.8$ Hz, H-4_a), δ: 2.55 (2H, t, $J = 4.3$ Hz, H-7), δ: 2.50 (1H, m, H-4_b), δ: 1.68 (2H, m, H-6).</p>

⁶⁶ WenYi *et al.*, 2007.

¹³C RMN

100 MHz, CD₃OD, δ: 212.2 (C-3), δ: 146.4 (C-3''), δ: 146.3 (C-3'), δ: 144.7 (C-4''), δ: 144.4 (C-4'), δ: 135.2 (C-1''), δ: 134.3 (C-1'), δ: 120.8 (C-6'), δ: 120.7 (C-6''), δ: 116.8 (C-2''), δ: 116.7 (C-2'), δ: 116.6 (C-5'), δ: 116.5 (C-5''), δ: 68.5 (C-5), δ: 51.5 (C-4), δ: 46.6 (C-2), δ: 40.6 (C-6), δ: 32.4 (C-7), δ: 30.3 (C-1).

La estructura del hirsutanonol (**II**) se corroboró analizando señales diagnósticas de los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN y por correlaciones de los espectros bidimensionales: en el espectro de ¹H-RMN se observaron señales de dos pares de hidrógenos en metilenos alfa a un grupo carbonilo con δ = 2.50 (H-4_b), 2.60 (H-4_a) y 2.73, así como un hidrógeno unido al carbono alfa del carbinol en la posición seis (δ = 1.68), todo lo anterior en la región de los protones alifáticos; se observaron señales de los hidrógenos aromáticos (δ = 6.51–6.68, 4H) donde se tiene un sistema ABX; también se observaron señales del hidrógeno base de C-O (δ = 4.03) y señales correspondientes a los hidrógenos bencílicos (δ = 2.74 y 2.55, 4H). Las asignaciones de los hidrógenos de la molécula se establecieron mediante la correlación de los experimentos COSY, HSQC y HMBC; en el espectro de ¹³C-RMN se observaron 19 señales, correspondientes a siete carbonos de la cadena alifática, de los cuales uno corresponde al carbonilo en C-3 (δ = 212.2), dos carbonos bencílicos (δ = 30.3-32.4), dos carbonos alfa al carbonilo (δ = 46.6 y 51.5) y un carbono base de oxígeno en C-5 (δ = 68.5) unido al hidroxilo, un carbono alfa al carbinol (δ = 40.6), así como doce señales empalmadas de los carbonos aromáticos (δ = 120.7–146.4). El signo del índice de rotación óptica experimental del compuesto **II** coincidió con el reportado en la literatura (ver **Tabla 8**).

9.2.3. Aislamiento de (5S)-hidroxi-1,7-bis-(4-hidroxifenil)-heptan-3-ona (platifilonol) [III].

Durante el proceso de purificación por HPLC tipo preparativo de la **fracción FXVII (Figura 14)** del extracto de 1-BuOH se aisló un compuesto de aspecto aceitoso color amarillo pálido, cuya identidad se corroboró mediante la determinación y análisis de sus características espectroscópicas de $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$ (**Tabla 9**) y las correlaciones obtenidas de los experimentos bidimensionales (**Anexo I**), así como por la comparación de los datos reportados en la literatura y el signo del índice de rotación óptica⁶⁷. Las características espectroscópicas de este compuesto se encuentran reportadas en la especie *Curcuma comosa* (familia Zingiberaceae), donde se aisló previamente⁶⁸. Cabe señalar que el platifilonol (**III**) no se ha reportado en la especie *Alnus acuminata* ssp. *arguta* con anterioridad.

Tabla 9. Datos espectroscópicos del platifilonol (**III**).

Datos	
Fórmula molecular	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$ (PM = 314 g mol⁻¹)
Estructura	
Rotación óptica teórica	$[\alpha]_D^{20} = -1.8^\circ$ ($c=1.0$, Me_2CO)
Rotación óptica experimental	$[\alpha]_D^{20} = -0.002^\circ$ ($c=0.5$, Me_2CO)
$^1\text{H RMN}$	<p>500 MHz, CD_3OD, δ: 7.02 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-6'), δ: 7.02 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2'), δ: 7.02 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-6''), δ: 7.02 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2''), δ: 6.72 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-3'), δ: 6.72 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), δ: 6.71 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-3''), δ: 6.71 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5''), δ: 4.04 (1H, quint., $J = 6.2$ Hz, H-5), δ: 2.78 (2H, q, $J = 6.0$ Hz, H-1), δ: 2.76 (2H, q, $J = 5.5$ Hz, H-2), δ: 2.68 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-4_a), δ: 2.64 (2H, q, $J = 8.2$ Hz, H-7), δ: 2.56 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-4_b), δ: 2.54 (2H, t, $J = 4.5$ Hz, H-6).</p>

⁶⁷ Park *et al.*, 2010.

⁶⁸ Winuthayanon *et al.*, 2009.

¹³C RMN

100 MHz, CD₃OD, δ: 212.1 (C-3), δ: 156.8 (C-4''), δ: 156.6 (C-4'), δ: 134.3 (C-1''), δ: 133.4 (C-1'), δ: 130.5 (C-2''), δ: 130.5 (C-6''), δ: 130.4 (C-2'), δ: 130.4 (C-6'), δ: 116.3 (C-3''), δ: 116.3 (C-5''), δ: 116.2 (C-3'), δ: 116.2 (C-5'), δ: 68.4 (C-5), δ: 51.4 (C-4), δ: 46.5 (C-2), δ: 40.7 (C-6), δ: 32.1 (C-7), δ: 30.0 (C-1).

La estructura del platifilonol (**III**) se corroboró analizando señales diagnósticas de los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN y por correlaciones de los espectros bidimensionales. En el espectro de ¹H-RMN se observaron señales de dos pares de hidrógenos en metilenos alfa a un grupo carbonilo (δ = 2.68 (H-4a), 2.64 (H-4b) y 2.76) y un hidrógeno unido al carbono alfa del carbinol (C-6, δ = 2.54), esto en la región de los protones alifáticos; además, se observaron señales de los hidrógenos aromáticos (δ = 6.71–7.02) donde se muestra un sistema A₂B₂; también se observaron señales del hidrógeno en un carbono base de oxígeno (δ = 4.04) y señales correspondientes a los hidrógenos bencílicos (δ = 2.54, 2.78, 4H). Las asignaciones de los hidrógenos en la molécula se confirmaron mediante los experimentos COSY, HSQC y HMBC. En el espectro de ¹³C-RMN se observaron 19 señales: siete correspondientes a carbonos de la cadena alifática, de los cuales uno corresponde al carbonilo en C-3 (δ = 212.1), dos carbonos bencílicos (δ = 30.0 y 32.1), dos carbonos alfa al carbonilo (δ = 46.5 y 51.4) y un carbono base de oxígeno en C-5 (δ = 68.4) unido al hidroxilo; además un carbono alfa al carbinol (δ = 40.7), así como doce carbonos aromáticos (δ = 116.2–156.8). El valor del índice de rotación óptica experimental del compuesto **III** coincidió con el reportado en la literatura (ver **Tabla 9**).

9.2.4. Aislamiento de (*E*)-1,7-bis-(4-hidroxifenil)-3-hepten-5-ona (platifilenona) [IV].

Durante el subfraccionamiento de la **fracción primaria VII (Figura 12)** obtenido del extracto de AcOEt se detectó un compuesto polvoso color café claro, cuya identidad correspondió al compuesto **IV**, siendo corroborado por el R_f en CCD, el cual correspondió con un estándar de platifilenona obtenido en trabajos previos, con el tiempo de retención que se registró en las eluciones por HPLC (19.01 min., ver **Apartado 8.4.3.1., Adecuabilidad del Sistema**), el cual correspondió con el del estándar **IV**, y mediante las características espectroscópicas que se muestran en la **Tabla 10** y en el **Anexo I**, así como por el análisis comparativo de las constantes espectroscópicas reportadas en la literatura respecto al compuesto aislado de la especie *Alnus japonica* (familia Betulaceae)⁶⁹.

Tabla 10. Datos espectroscópicos de la platifilenona (IV).

Datos	
Fórmula molecular	$C_{19}H_{20}O_3$ (PM = 296 g mol ⁻¹)
Estructura	
¹ H RMN	<p>400 MHz, CDCl₃, δ: 7.33 (1H, t, <i>J</i> = 8.4 Hz, H-6'), δ: 7.33 (1H, t, <i>J</i> = 8.4 Hz, H-2'), δ: 7.33 (1H, t, <i>J</i> = 8.4 Hz, H-6''), δ: 7.33 (1H, t, <i>J</i> = 8.4 Hz, H-2''), δ: 7.11 (1H, dt, <i>J</i> = 15.5 Hz, H-5), δ: 7.06 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz, H-3'), δ: 7.06 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz, H-5'), δ: 7.05 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz, H-3''), δ: 7.05 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz, H-5''), δ: 6.38 (1H, d, <i>J</i> = 16.0 Hz, H-4), δ: 3.12 (2H, t, <i>J</i> = 5.0 Hz, H-2), δ: 3.08 (2H, t, <i>J</i> = 3.3 Hz, H-1), δ: 3.00 (2H, t, <i>J</i> = 7.5 Hz, H-7), δ: 2.78 (2H, dd, <i>J</i> = 6.9 Hz, H-6).</p>
¹³ C RMN	<p>100 MHz, CDCl₃, δ: 199.8 (C-3), δ: 154.1 (C-4''), δ: 154.0 (C-4)', δ: 146.5 (C-5), δ: 133.0 (C-1''), δ: 133.0 (C-1)', δ: 130.9 (C-4), δ: 129.6 (C-2''), δ: 129.6 (C-6''), δ: 129.5 (C-2'), δ: 129.5 (C-6'), δ: 115.5 (C-3''), δ: 115.5 (C-5''), δ: 115.4 (C-3'), δ: 115.4 (C-5'), δ: 42.1 (C-2), δ: 34.5 (C-7), δ: 33.7 (C-6), δ: 29.5 (C-1).</p>

⁶⁹ Masayasu *et al.*, 1981.

La estructura de la platifilenona (**IV**) se corroboró con las señales diagnósticas de los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, así como de los espectros bidimensionales. En el espectro de ^1H -RMN se observó una señal doble ($J = 8.4$ Hz), integrando para cuatro hidrógenos correspondiendo a los hidrógenos H-2', H-6', H-2'' y H-6''; un segundo doblete ($J = 8.5$ Hz) que integró para dos protones en $\delta = 7.06$ (H-3' y H-5') y otro doblete en $\delta = 7.05$ ($J = 8.5$ Hz, H-3'' y H-5''). Estas señales y sus constantes de acoplamiento corresponden a un sistema A_2B_2 , lo que indica que los anillos unidos a las cadenas alifáticas se encontraban disustituídos en posición *para*. La asignación de las señales se corroboró con base en las correlaciones observadas en el espectro HMBC; en la zona de hidrógenos alifáticos se observaron señales correspondientes a: los cuatro grupos metileno de la cadena de heptano, de los cuales los desplazados a campo más bajo fueron los hidrógenos de dos metilenos bencílicos (H-1 y H-7) y un metileno alfa al grupo carbonilo (H-2), así como un metileno vinílico en $\delta = 2.78$ de H-6; el doble enlace disustituído en posición *E* se visualizó por la presencia de dos dobletes amplios correspondientes a los hidrógenos H-4 y H-5 con J de 16.0 y 15.5 Hz, constantes de acoplamiento característica de hidrógenos vinílicos. En el espectro de ^{13}C -RMN se observaron 19 señales correspondientes a siete carbonos de la cadena alifática con una señal de un carbono característica del carbonilo en C-3 ($\delta = 199.8$), dos carbonos bencílicos C-1 y C-7 ($\delta = 29.5$ y 34.5), un carbono alfa al carbonilo C-2 ($\delta = 42.1$), un carbono alílico (C-6, $\delta = 33.7$) y dos carbonos correspondientes a la insaturación en C-4 ($\delta = 130.9$) y C-5 ($\delta = 146.5$). También se observaron doce señales empalmadas con diferente desplazamiento en la zona de carbonos aromáticos ($\delta = 115.4$ – 154.1). La correlación de los hidrógenos con los carbonos correspondientes se comprobó a través de los experimentos HSQC.

9.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC

9.3.1. VALIDACIÓN DEL SISTEMA

En este apartado se presenta el protocolo de validación del método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, realizando la determinación de los diferentes parámetros que se evaluaron estadísticamente mediante la paquetería Microsoft Office Excel 2010.

9.3.1.1. Adecuabilidad del sistema

Se evaluó por quintuplicado una solución de referencia que contenía los compuestos mayoritarios a una concentración equivalente al 100% de la concentración de trabajo la cual fue preparada a partir de la solución **stock B**. Las respuestas analíticas (área bajo la curva, ABC) para cada compuesto fueron registradas, de modo que se calculó: la media aritmética (\bar{y}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (%CV). Los datos se muestran en la **Tabla 11** y los parámetros cromatográficos en la **Tabla 12**.

Tabla 11. Resultados para la adecuabilidad del sistema.

Inyecciones	Áreas bajo la curva ($\mu\text{V/s}$)				Criterio de aceptación
	oregonina	hirsutanonol	platifilonol	platifilenona	
1	329140	789337	426595	73052	
2	331340	787569	428879	73696	
3	330159	787009	424119	73286	
4	328743	786276	427470	73650	
5	329803	790589	426642	73816	
\bar{y}	329837.0	788156.2	426741.0	73500.0	-
S	1005.8	1768.6	1732.7	319.0	-
%CV	0.3%	0.2%	0.4%	0.4%	$\leq 2.0\%$

Tabla 12. Resultados y parámetros cromatográficos para la adecuabilidad del sistema.

Parámetro	oregonina	hirsutanonol	platifilonol	platifilenona	Criterio de aceptación
Tiempo de retención (min)	12.434	13.655	18.164	19.016	-
Tiempo muerto (min)	3.98	3.98	3.98	3.98	-
Factor de capacidad k'	2.1241	2.4309	3.5638	3.7779	>2
Factor de coleo	1.33	1.15	1.31	1.20	<2
Número de platos teóricos por columna	15209	7652	39026	71771	>2000
Resolución respecto al pico cromatográfico anexo	3.606	3.807	6.857	7.279	>2

9.3.1.2. Precisión del sistema

Este parámetro se evaluó inyectando seis soluciones preparadas por dilución independiente a partir de la solución **stock B**, conteniendo los cuatro compuestos a una concentración equivalente al 100% de la concentración de trabajo. Se registraron las respuestas analíticas y se calculó: la media aritmética (\bar{y}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (%CV), éste último siendo $\leq 2.0\%$ como criterio de aceptación. Los datos se muestran en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Resultados para la precisión del sistema.

Inyecciones	Áreas bajo la curva ($\mu\text{V/s}$)				Criterio de aceptación
	oregonina	hirsutanonol	platifilonol	platifilenona	
1	510973	905042	509081	105803	
2	508310	901567	509975	105207	
3	510013	903535	510878	103524	
4	509604	906889	507924	104084	
5	509881	904227	513799	102982	
6	511051	906319	510025	106234	
\bar{y}	509972.0	904596.5	510272.0	104639.0	-
S	1007.4	1942.3	1976.7	1305.3	-
%CV	0.2%	0.2%	0.4%	1.3%	$\leq 2.0\%$

9.3.1.3. Linealidad del sistema

Éste parámetro se comprobó inyectando por triplicado soluciones que contenían los cuatro compuestos mayoritarios partiendo de la solución **stock B**, con concentraciones equivalentes al 12.5, 25, 50, 100, 200 y 300% respecto a la concentración de trabajo estipulada. Una vez obtenida la respuesta analítica se calcularon los siguientes parámetros: la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2), el coeficiente de correlación lineal (r), los intervalos de confianza para las ordenadas al origen [$IC(\beta_0)$] y los intervalos de confianza para las pendientes [$IC(\beta_1)$]. Los resultados analizados estadísticamente con un nivel de confianza del 95% se muestran en las **Tablas 14-29**, los gráficos de linealidad del sistema de los compuestos en los **Gráficos 1, 3, 5 y 7**, así como los gráficos de residuales en los **Gráficos 2, 4, 6 y 8**.

9.3.1.3.1. Linealidad del sistema para la oregonina

Tabla 14. Resultados de la linealidad del sistema para la oregonina.

Nivel de concentración	Concentración relativa (%)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	ABC ($\mu\text{V/S}$)	%CV
1	12.5	25	155168	1.2%
	12.5	25	154071	
	12.5	25	157691	
2	25	50	209590	0.9%
	25	50	208493	
	25	50	212113	
3	50	100	317579	0.5%
	50	100	320439	
	50	100	318710	
4	100	200	499314	0.6%
	100	200	495011	
	100	200	500360	
5	150	300	653963	1.9%
	150	300	649660	
	150	300	673009	
6	200	400	819022	0.3%
	200	400	814104	
	200	400	817453	
7	300	600	1208166	1.7%
	300	600	1170114	
	300	600	1198962	

Los parámetros cromatográficos para evaluar la linealidad del sistema se calcularon mediante el programa estadístico contenido en Microsoft Office Excel 2010 utilizando todos los datos aislados. Para la construcción de la gráfica de linealidad (**Gráfico 1**) se agruparon los datos aislados de las respuestas analíticas. Para ello se obtuvo la ecuación de la recta $y = b_1x + b_0$, donde y representa el área de la respuesta cromatográfica, b_1 la pendiente de la recta, b_0 la ordenada al origen y x la concentración de la muestra ($\mu\text{g/mL}$). En la **Tabla 14** se muestran los resultados obtenidos con un nivel de confianza del 95%; en la **Tabla 15** se muestran los criterios de aceptación, los cuales fueron aceptables: $r^2 \geq 0.98$, $r \geq 0.999$, el $\text{IC}(\beta_0)$ incluyó el cero y el $\text{IC}(\beta_1)$ es diferente de cero; en las **Tablas 16** y **17** se muestra la evidencia estadística que corrobora la linealidad del sistema para la oregonina; y en el **Gráfico 2** se observa el gráfico de residuales.

Tabla 15. Parámetros cromatográficos de la linealidad del sistema para la oregonina.

Parámetro de desempeño	Resultado obtenido	Criterio de aceptación
b_1	1770.0	-
b_0	126616.9	-
r	0.9991	≥ 0.999
r^2	0.9982	≥ 0.98
$S_{y/x}$	15460.6	-
S_{b_1}	17.4	-
$IC(\beta_0)$	-263239.3 266779.2	Incluye al cero
$IC(\beta_1)$	1733.5 1806.4	Diferente de cero

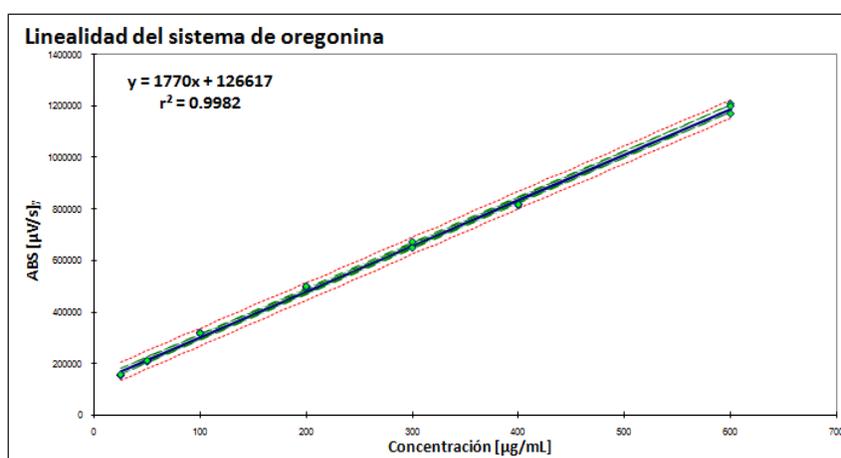


Gráfico 1. Linealidad del sistema para la oregonina.

Tabla 16. Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del sistema para la oregonina.

Parámetro de desempeño	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β_0)	126616.941	5364.12183	23.604412	1.5359E-15	-263239.3	266779.2
Ordenada al origen (β_1)	1769.95746	17.4280963	101.557704	1.8631E-27	1733.5	1806.4

Tabla 17. Análisis de varianza de la linealidad del sistema para la oregonina.

Parámetro de desempeño	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2.4654E+12	2.46536E+12	10313.9673	1.8631E-27
Residuos	19	4541596314	239031384.9		
Total	20	2.4699E+12			

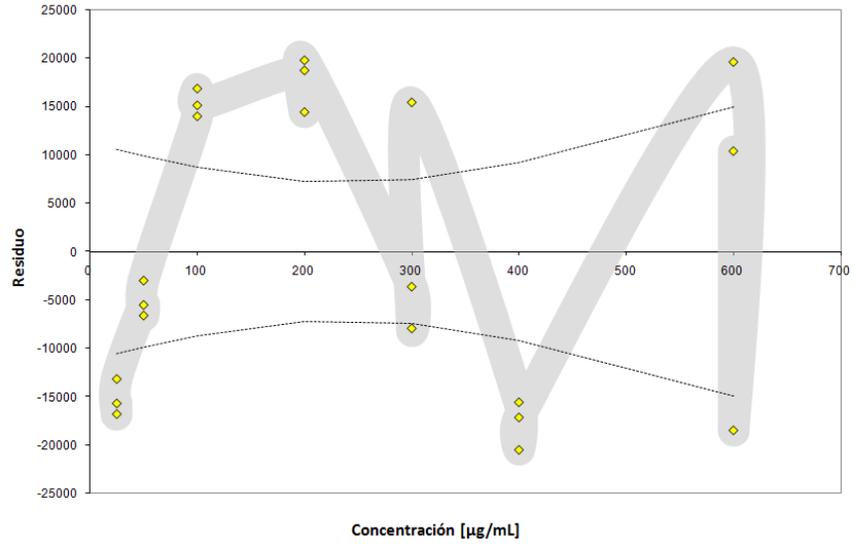


Gráfico 2. Gráfico de residuales para el modelo de linealidad del sistema de la oregonina.

9.3.1.3.2. Linealidad del sistema para el hirsutanonol

Tabla 18. Resultados de la linealidad del sistema para el hirsutanonol.

Nivel de concentración	Concentración relativa (%)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	ABC ($\mu\text{V/S}$)	%CV
1	12.5	10	122001	0.7%
	12.5	10	121144	
	12.5	10	122825	
2	25	20	204305	0.4%
	25	20	203416	
	25	20	205097	
3	50	40	398603	0.2%
	50	40	397280	
	50	40	398944	
4	100	80	774385	0.2%
	100	80	776028	
	100	80	777502	
5	150	120	1075936	1.5%
	150	120	1091269	
	150	120	1058788	
6	200	160	1364368	0.8%
	200	160	1367502	
	200	160	1347193	
7	300	240	2010690	0.8%
	300	240	2041039	
	300	240	2039409	

Los parámetros cromatográficos para evaluar la linealidad del sistema se calcularon mediante el programa estadístico contenido en Microsoft Office Excel 2010 utilizando todos los datos aislados. Para la construcción de la gráfica de linealidad (**Gráfico 3**) se agruparon los datos aislados de las respuestas analíticas. Para ello se obtuvo la ecuación de la recta $y = b_1x + b_0$, donde y representa el área de la respuesta cromatográfica, b_1 la pendiente de la recta, b_0 la ordenada al origen y x la concentración de la muestra ($\mu\text{g/mL}$). En la **Tabla 18** se muestran los resultados obtenidos con un nivel de confianza del 95%; en la **Tabla 19** se muestran los criterios de aceptación, los cuales fueron aceptables: $r^2 \geq 0.98$, $r \geq 0.999$, el $\text{IC}(\beta_0)$ incluyó el cero y el $\text{IC}(\beta_1)$ es diferente de cero; en las **Tablas 20** y **21** se muestra la evidencia estadística que corrobora la linealidad del sistema para el hirsutanonol; y en el **Gráfico 4** se observa el gráfico de residuales.

Tabla 19. Parámetros cromatográficos de la linealidad del sistema para el hirsutanonol.

Parámetro de desempeño	Resultado obtenido	Criterio de aceptación
b_1	8247.9	-
b_0	62839.5	-
r	0.9990	≥ 0.999
r^2	0.9980	≥ 0.98
$S_{y/x}$	29743.3	-
S_{b1}	83.8	-
$IC(\beta_0)$	-123275.3 139771.0	Incluye al cero
$IC(\beta_1)$	8072.4 8423.2	Diferente de cero

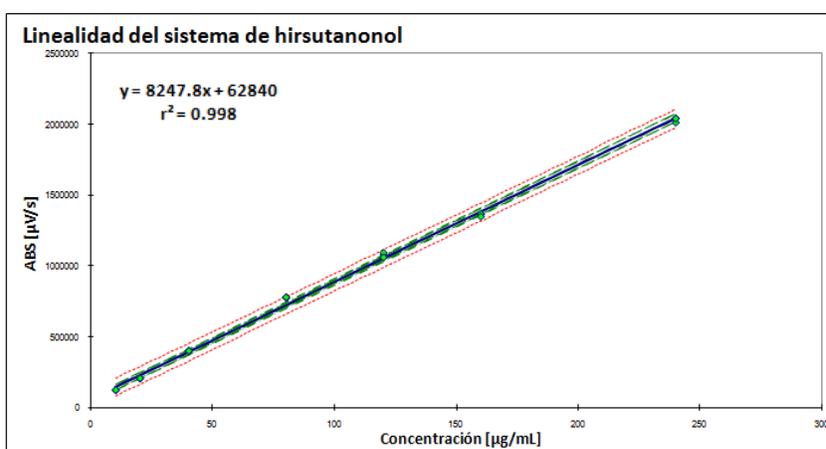


Gráfico 3. Linealidad del sistema para el hirsutanonol.

Tabla 20. Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del sistema para el hirsutanonol.

Parámetro de desempeño	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β_0)	62839.5364	10319.5339	6.08937739	7.4312E-06	-123275.3	139771.0
Ordenada al origen (β_1)	8247.80783	83.8207245	98.3981931	3.3928E-27	8072.4	8423.2

Tabla 21. Análisis de varianza de la linealidad del sistema para el hirsutanonol.

Parámetro de desempeño	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	8.5655E+12	8.5655E+12	9682.2044	3.3928E-27
Residuos	19	1.6809E+10	884662924		
Total	20	8.5823E+12			

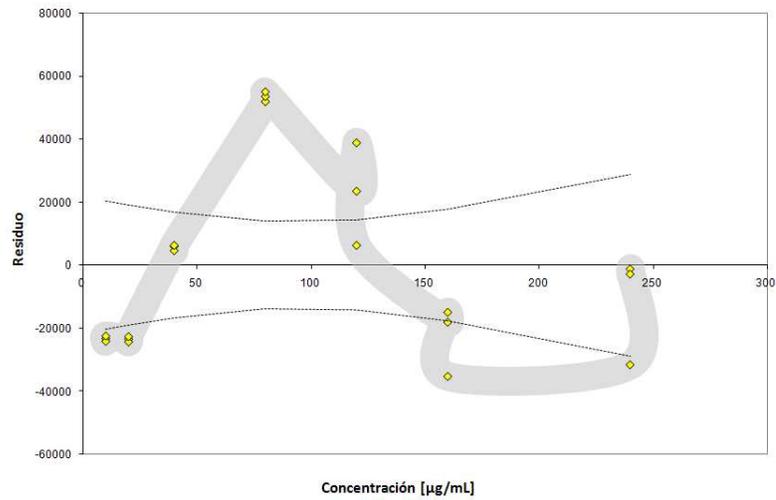


Gráfico 4. Gráfico de residuales para el modelo de linealidad del sistema del hirsutanonol.

9.3.1.3.3. Linealidad del sistema para el platifilonol

Tabla 22. Resultados de la linealidad del sistema para el platifilonol.

Nivel de concentración	Concentración relativa (%)	Concentración (µg/mL)	ABC (µV/S)	%CV
1	12.5	15	80294	0.6%
	12.5	15	79389	
	12.5	15	80131	
2	25	30	126809	0.7%
	25	30	125540	
	25	30	127316	
3	50	60	242622	0.3%
	50	60	241651	
	50	60	242930	
4	100	120	480257	0.4%
	100	120	480936	
	100	120	484254	
5	150	180	699887	0.2%
	150	180	698263	
	150	180	700667	
6	200	240	919304	0.4%
	200	240	912990	
	200	240	917104	
7	300	360	1306663	0.1%
	300	360	1304574	
	300	360	1307940	

Los parámetros cromatográficos para evaluar la linealidad del sistema se calcularon mediante el programa estadístico contenido en Microsoft Office Excel 2010 utilizando todos los datos aislados. Para la construcción de la gráfica de linealidad (**Gráfico 5**) se agruparon los datos aislados de las respuestas analíticas. Para ello se obtuvo la ecuación de la recta $y = b_1x + b_0$, donde y representa el área de la respuesta cromatográfica, b_1 la pendiente de la recta, b_0 la ordenada al origen y x la concentración de la muestra (µg/mL). En la **Tabla 22** se muestran los resultados obtenidos con un nivel de confianza del 95%; en la **Tabla 23** se muestran los criterios de aceptación, los cuales fueron aceptables: $r^2 \geq 0.98$, $r \geq 0.999$, el IC(β_0) incluyó el cero y el IC(β_1) es diferente de cero; en las **Tablas 24 y 25** se muestra la evidencia estadística que corrobora la linealidad del sistema para el platifilonol; y en el **Gráfico 6** se observa el gráfico de residuales.

Tabla 23. Parámetros cromatográficos de la linealidad del sistema para el platifilonol.

Parámetro de desempeño	Resultado obtenido	Criterio de aceptación
b_1	3603.9	-
b_0	33040.5	-
r	0.9992	≥ 0.999
r^2	0.9985	≥ 0.98
$S_{y/x}$	17003.0	-
S_{b_1}	31.9	-
IC(β_0)	-65549.9 3670.7	Incluye al cero
IC(β_1)	3537.0 3670.7	Diferente de cero

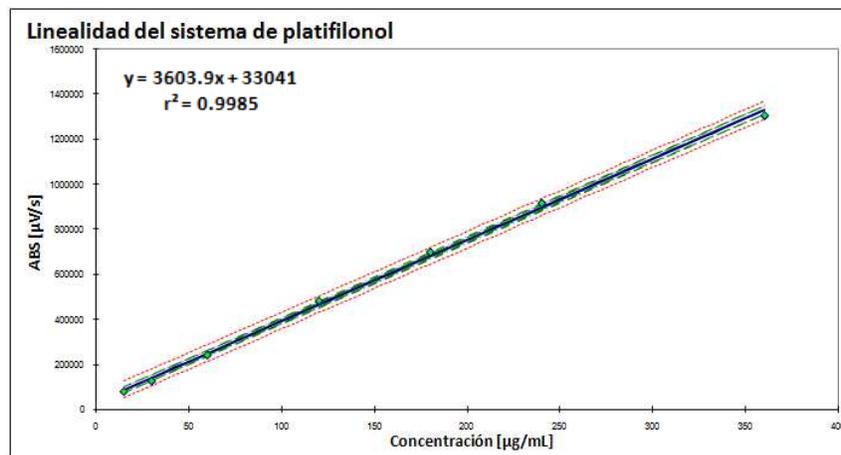


Gráfico 5. Linealidad del sistema para el platifilonol.

Tabla 24. Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del sistema para el platifilonol.

Parámetro de desempeño	Coficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β_0)	33040.5034	5899.2465	5.60080061	2.1159E-05	-65549.9	3670.7
Ordenada al origen (β_1)	3603.87079	31.9445381	112.816494	2.5355E-28	3537.0	3670.7

Tabla 25. Análisis de varianza de la linealidad del sistema para el platifilonol.

Parámetro de desempeño	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	3.6796E+12	3.6796E+12	12727.5613	2.5355E-28
Residuos	19	5492933615	289101769		
Total	20	3.6851E+12			

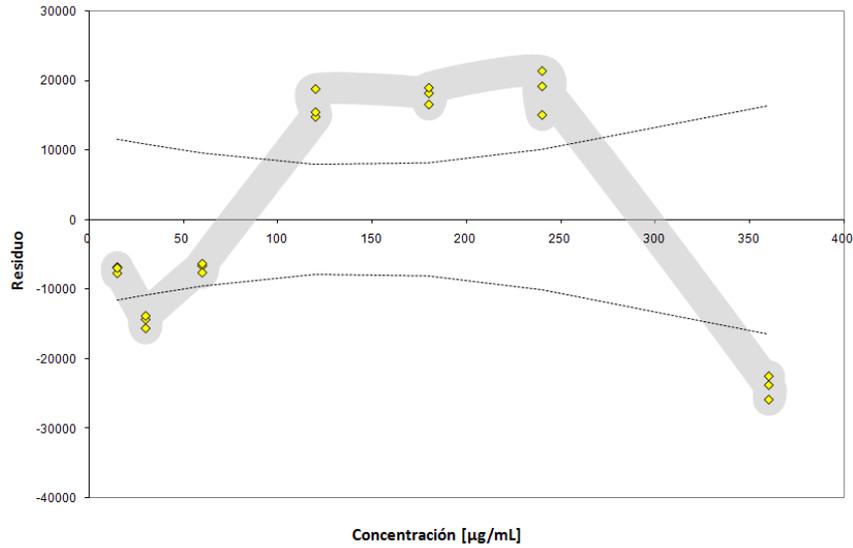


Gráfico 6. Gráfico de residuales para el modelo de linealidad del sistema del platifilonol.

9.3.1.3.4. Linealidad del sistema para la platifenona

Tabla 26. Resultados de la linealidad del sistema para la platifenona.

Nivel de concentración	Concentración relativa (%)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	ABC ($\mu\text{V/S}$)	%CV
1	12.5	1.25	15417	1.6%
	12.5	1.25	14983	
	12.5	1.25	15396	
2	25	2.5	23282	1.1%
	25	2.5	24117	
	25	2.5	24461	
3	50	5	44718	0.4%
	50	5	44407	
	50	5	44406	
4	100	10	79401	0.4%
	100	10	79843	
	100	10	79302	
5	150	15	105417	0.4%
	150	15	105040	
	150	15	105918	
6	200	20	137963	1.4%
	200	20	136807	
	200	20	134807	
7	300	30	202297	0.1%
	300	30	202213	
	300	30	201937	

Los parámetros cromatográficos para evaluar la linealidad del sistema se calcularon mediante el programa estadístico contenido en Microsoft Office Excel 2010 utilizando todos los datos aislados. Para la construcción de la gráfica de linealidad (**Gráfico 7**) se agruparon los datos aislados de las respuestas analíticas. Para ello se obtuvo la ecuación de la recta $y = b_1x + b_0$, donde y representa el área de la respuesta cromatográfica, b_1 la pendiente de la recta, b_0 la ordenada al origen y x la concentración de la muestra ($\mu\text{g/mL}$). En la **Tabla 26** se muestran los resultados obtenidos con un nivel de confianza del 95%; en la **Tabla 27** se muestran los criterios de aceptación, los cuales fueron aceptables: $r^2 \geq 0.98$, $r \geq 0.999$, el $\text{IC}(\beta_0)$ incluyó el cero y el $\text{IC}(\beta_1)$ es diferente de cero; en las **Tablas 28** y **29** se muestra la evidencia estadística que corrobora la linealidad del sistema para la platifenona; y en el **Gráfico 8** se observa el gráfico de residuales.

Tabla 27. Parámetros cromatográficos de la linealidad del sistema para la platifenona.

Parámetro de desempeño	Resultado obtenido	Criterio de aceptación
b_1	6409.1	-
b_0	10095.4	-
r	0.9990	≥ 0.999
r^2	0.9980	≥ 0.98
$S_{y/x}$	2890.4	-
S_{b1}	65.2	-
IC(β_0)	-14562.6 6550.7	Incluye al cero
IC(β_1)	6272.7 6545.4	Diferente de cero

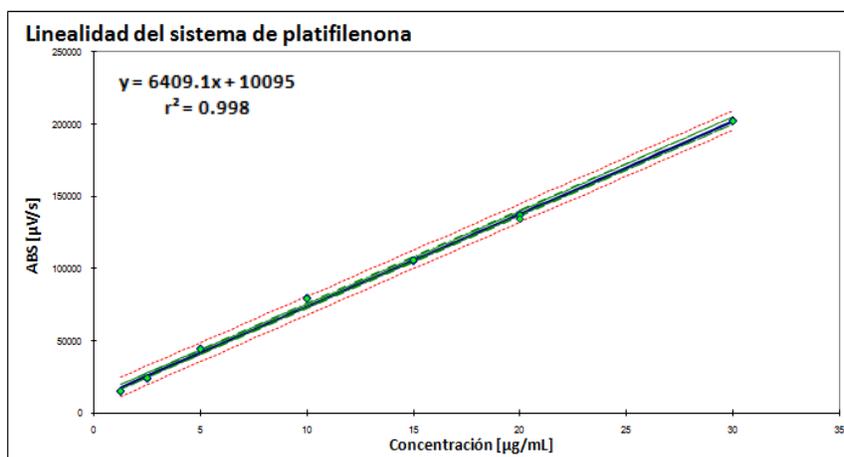


Gráfico 7. Linealidad del sistema para la platifenona.

Tabla 28. Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del sistema para la platifenona.

Parámetro de desempeño	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β_0)	10095.3675	1002.82755	10.0669028	4.7265E-09	-14562.6	6550.7
Ordenada al origen (β_1)	6409.05187	65.1639756	98.3526836	3.4226E-27	6272.7	6545.4

Tabla 29. Análisis de varianza de la linealidad del sistema para la platifilenona.

Parámetro de desempeño	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	8.0813E+10	8.0813E+10	9673.25038	3.4226E-27
Residuos	19	158731740	8354302.11		
Total	20	8.0972E+10			

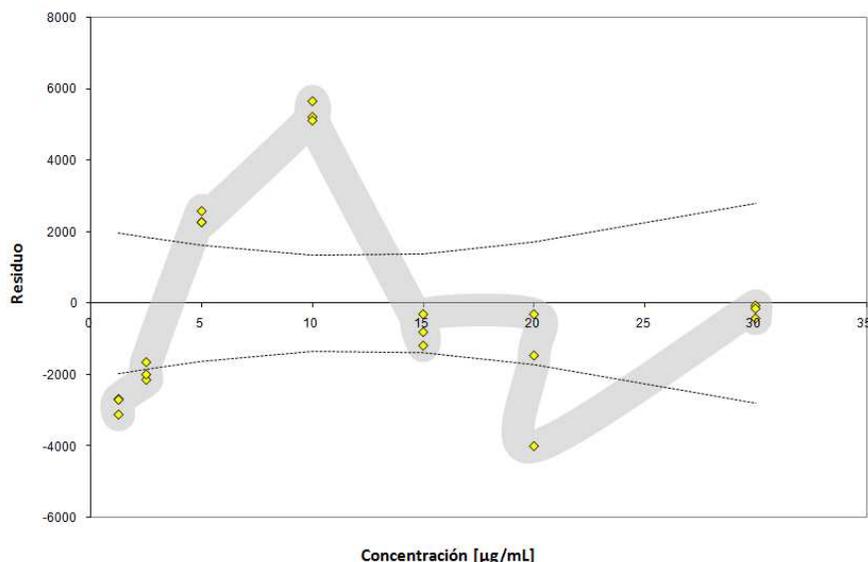


Gráfico 8. Gráfico de residuales para el modelo de linealidad del sistema de la platifilenona.

9.3.1.4. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LD) corresponde a la concentración mínima del analito que puede ser detectada en la muestra, mientras que el límite de cuantificación (LC) corresponde a la concentración mínima del analito que se determina cumpliendo con los parámetros de precisión y exactitud, y bajo las condiciones de operación establecidas, conservando el mismo comportamiento lineal del sistema.

Para la determinación de LC y LD se llevaron a cabo diluciones sucesivas a partir de la solución **stock B** por triplicado, evaluando niveles de concentración equivalentes al 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, 25 y 50% de las concentraciones equivalentes de trabajo para cada compuesto. Los resultados se muestran en la **Tabla 30**.

Tabla 30. Resultados para LD y LC y obtención de la curva de calibración lineal.

Compuesto	Concentración (µg/mL)	Inyección 1	Inyección 2	Inyección 3	%CV
oregonina (I)	100	509743	501023	508994	1.0%
	50	311653	308796	309102	0.5%
	25	207437	209601	208910	0.5%
	12.5	156236	158137	159031	0.9%
	6.3	135388	139103	137291	1.4%
	3.1	67841	65136	64639	2.6%
hirsutanonol (II)	40	395486	401065	402350	0.9%
	20	209816	207065	206512	0.9%
	10	124259	125487	124003	0.6%
	5	81148	82503	80938	1.7%
	2.5	59907	60142	61640	1.6%
	1.3	49494	51779	48875	3.1%
platifilonol (III)	60	245414	245924	245688	0.1%
	30	125229	123675	127329	1.5%
	15	80698	79836	83067	2.1%
	7.5	36545	37026	34450	3.8%
	3.8	19323	20274	21037	4.3%
	1.4	11943	12918	12186	4.1%
platifilenona (IV)	5	44987	45064	44409	0.8%
	2.5	23879	23591	23196	1.5%
	1.3	15524	15015	15372	1.7%
	0.6	7300	6860	6579	5.3%
	0.3	3136	3621	3707	8.8%
	0.2	1083	1897	1147	32.9%

Los compuestos **I** y **II** se detectaron hasta la concentración de 6.0 y 2.3 µg/mL, conservando respectivamente la simetría de los picos cromatográficos, por lo que se puede estimar su LD a concentraciones de 6.0 y 2.3 µg/mL, respectivamente. Estos compuestos mostraron un %CV menor al 2% hasta las concentraciones de 6.3 y 5.0 µg/mL, por lo que puede estimarse el LC en el compuesto **I** en y para el compuesto **II** en 6.3 y 5.0 µg/mL. El compuesto **III** se detectó a concentraciones inferiores a 0.8 µg/mL, por lo que el LD se estima en 820 ng/mL, presentando un %CV inferior al 2% hasta la concentración de 1.4 µg/mL, por lo que su LC se calcula en 1375 ng/mL. El compuesto **IV** fue detectado hasta la concentración de 0.8 µg/mL; su LD se estima en 810 ng/mL y presentó un %CV inferior a 2% hasta la concentración de 0.6 µg/mL, por lo que su LC se estima en 625 ng/mL. Los valores de LD y LC se resumen en la **Tabla 31**.

Tabla 31. Resultados para LD y LC para los compuestos mayoritarios de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*.

Compuesto	LD (µg/mL)	LC (µg/mL)
I	6.0	6.3
II	2.3	5.0
III	0.8	1.4
IV	0.8	0.6

9.3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO POR HPLC

9.3.2.1. Linealidad y exactitud del método

Para la realización de la validación del método analítico y la determinación de la linealidad y exactitud, se utilizó la matriz vegetal de trabajo empleada en el **Apartado 8.4.2.1.**, la cual consistió del extracto de MeOH de la corteza y del extracto de la mezcla de la corteza y madera de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*. A los extractos mencionados se les realizó el método de adición patrón, de modo que se adicionaron cantidades conocidas de cada compuesto marcador correspondiente a las concentraciones relativas equivalentes al 50%, 100% y 150% de las *concentraciones de trabajo* establecidas en el **Apartado 8.4.2.2.** Lo anterior se llevó a cabo por triplicado y por pesadas independientes, de modo que a la respuesta analítica obtenida (ABC) se le restó la respuesta previamente obtenida para cada compuesto marcador contenido en la matriz vegetal. Estas muestras se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos, registrando las respuestas y calculando el porcentaje de recobro de cada muestra, los coeficientes de determinación (r^2), los coeficientes de correlación lineal (r), las pendientes (b_1), las ordenadas al origen (b_0), los intervalos de confianza para las ordenadas al origen [$IC(\beta_0)$], los intervalos de confianza para las pendientes [$IC(\beta_1)$], las medias poblacionales (\bar{y}), las desviaciones estándar (S), los coeficientes de variación de la regresión ($CV_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la media poblacional ($IC(\mu)$).

Las respuestas analíticas obtenidas con un nivel de confianza del 95% para la linealidad del método y los parámetros cromatográficos de los compuestos **I, II, III y IV** se agrupan en las **Tablas 32, 33, 36, 39 y 42**; en las **Tablas 34, 35, 37, 38, 40, 41, 43, 44** se muestra la evidencia estadística que corrobora la linealidad del método para los cuatro compuestos; en los **Gráficos 9, 11, 13 y 15** se muestran las gráficas de linealidad para los cuatro compuestos; y en los **Gráficos 10, 12, 14, 16** se observan los gráficos de residuales para los cuatro compuestos marcadores.

Tabla 32. Resultados para la linealidad del método.

Matriz vegetal + oregonina				
Nivel de concentración	Concentración teórica (µg/mL)	Concentración relativa (%)	ABC (µV/S)	%CV
1	100	50	307916	0.6%
	100	50	305103	
	100	50	304769	
2	200	100	485411	0.3%
	200	100	487192	
	200	100	484473	
3	300	150	648991	0.2%
	300	150	651991	
	300	150	649773	
Matriz vegetal + hirsutanonol				
Nivel de concentración	Concentración teórica (µg/mL)	Concentración relativa (%)	ABC (µV/S)	%CV
1	40	50	398013	0.9%
	40	50	397217	
	40	50	391378	
2	80	100	747093	0.3%
	80	100	751643	
	80	100	749755	
3	120	150	1069363	0.2%
	120	150	1064316	
	120	150	1063144	
Matriz de trabajo + platifilonol				
Nivel de concentración	Concentración teórica (µg/mL)	Concentración relativa (%)	ABC (µV/S)	%CV
1	60	50	242276	1.6%
	60	50	247632	
	60	50	250176	
2	120	100	465779	0.6%
	120	100	461179	
	120	100	465539	
3	180	150	684516	0.3%
	180	150	685202	
	180	150	687780	
Matriz vegetal + platifilenona				
Nivel de concentración	Concentración teórica (µg/mL)	Concentración relativa (%)	ABC (µV/S)	%CV
1	5	50	42658	1.1%
	5	50	43356	
	5	50	42437	
2	10	100	75513	1.0%
	10	100	75965	
	10	100	76963	
3	15	150	108159	0.9%
	15	150	106807	
	15	150	106390	

Tabla 33. Parámetros cromatográficos de la linealidad del método para la oregonina.

Parámetro de desempeño	Resultado obtenido	Criterio de aceptación
N	3	-
b_1	1721.6	-
b_0	136302	-
R	0.9996	≥ 0.999
r^2	0.9993	≥ 0.98
$S_{y/x}$	4312.8	-
IC(β_0)	-8480.2 11923.4	Incluye al cero
IC(β_1)	126102.3 146501.7	Diferente de cero
%CV $_{y/x}$	0.9%	$\leq 2.0\%$

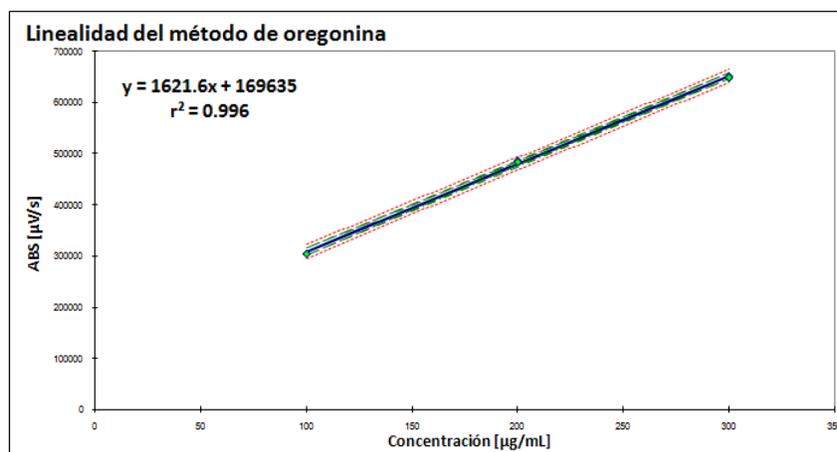


Gráfico 9. Linealidad del método para la oregonina.

Tabla 34. Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método para la oregonina.

Parámetro de desempeño	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β_0)	-78.9669232	2.9725842	-26.5650754	2.7432E-08	-8480.2	11923.4
Ordenada al origen (β_1)	0.00058043	5.936E-06	97.7808767	3.0833E-12	126102.3	146501.7

Tabla 35. Análisis de varianza de la linealidad del método para la oregonina.

Parámetro de desempeño	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	59956.1041	59956.1041	9561.09985	3.0833E-12
Residuos	7	43.895863	6.27083757		
Total	8	60000			

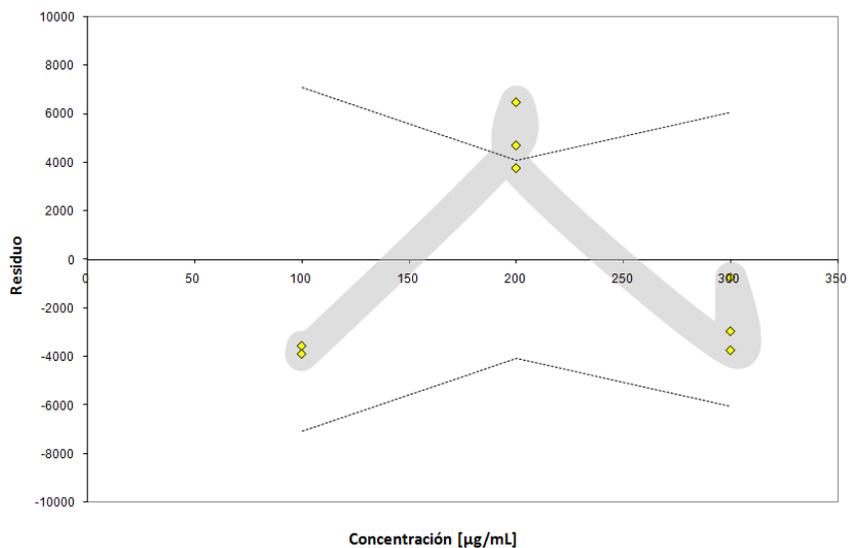


Gráfico 10. Gráfico de residuales para el modelo de linealidad del método de la oregonina.

Tabla 36. Parámetros cromatográficos de la linealidad del método para el hirsutanonol.

Parámetro de desempeño	Resultado obtenido	Criterio de aceptación
n	3	-
b₁	8763.4	-
b₀	52808.6	-
r	0.9992	≥0.999
r²	0.9984	≥0.98
S_{y/x}	12802.0	-
IC(β₀)	-21515.4 39042.2	Incluye al cero
IC(β₁)	22531.8 83085.3	Diferente de cero
%CV_{y/x}	1.7%	≤2.0%

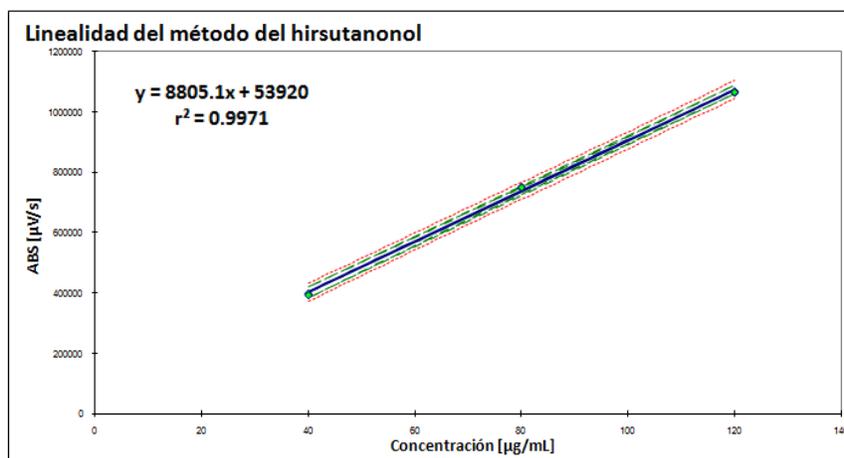


Gráfico 11. Linealidad del método para el hirsutanonol.

Tabla 37. Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método para el hirsutanonol.

Parámetro de desempeño	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β₀)	-7.7902192	1.16274894	-6.69982909	0.00027748	-21515.4	39042.2
Ordenada al origen (β₁)	0.00011908	1.4783E-06	80.5525317	1.1961E-11	22531.8	83085.3

Tabla 38. Análisis de varianza de la linealidad del método para el hirsutanonol.

Parámetro de desempeño	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	9589.65471	9589.65471	6488.71037	1.1961E-11
Residuos	7	10.3452888	1.47789841		
Total	8	9600			

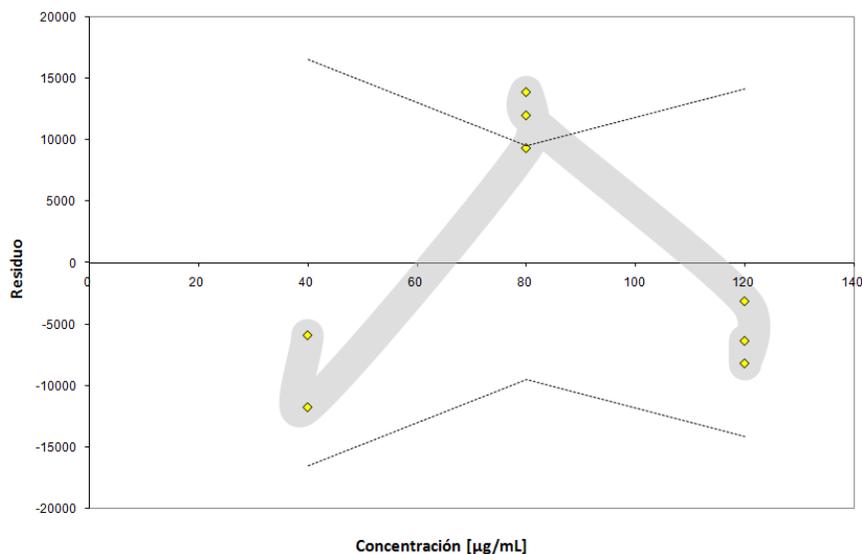


Gráfico 12. Gráfico de residuales para el modelo de linealidad del método del hirsutanonol.

Tabla 39. Parámetros cromatográficos de la linealidad del método para el platifilonol.

Parámetro de desempeño	Resultado obtenido	Criterio de aceptación
n	3	-
b₁	3826.2	-
b₀	19759.7	-
r	0.9997	≥0.999
r²	0.9994	≥0.98
S_{y/x}	5024.8	-
IC(β₀)	-8059.5 15711.8	Incluye al cero
IC(β₁)	7876.1 31643.3	Diferente de cero
%CV_{y/x}	1.1%	≤2.0%

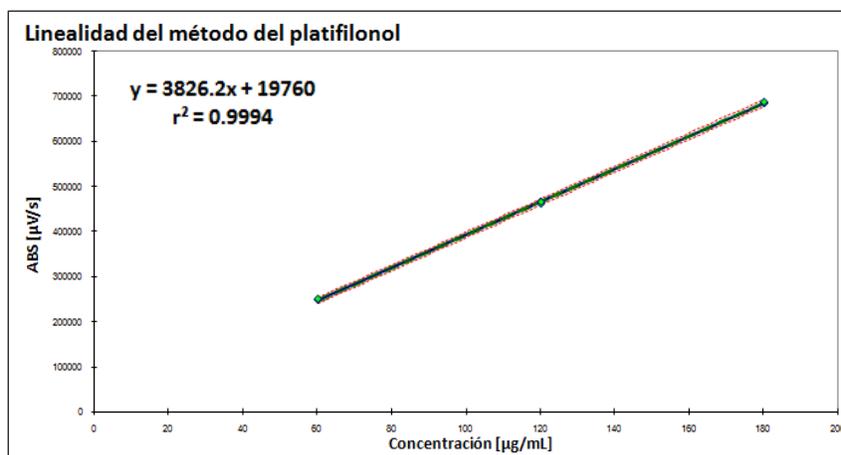


Gráfico 13. Linealidad del método para el platifilonol.

Tabla 40. Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método para el platifilonol.

Parámetro de desempeño	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β₀)	-7.19465629	0.74601889	-9.6440672	2.7154E-05	-8059.5	15711.8
Ordenada al origen (β₁)	0.00027321	1.4953E-06	182.704562	3.8837E-14	7876.1	31643.3

Tabla 41. Análisis de varianza de la linealidad del método para el platifilonol.

Parámetro de desempeño	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	21595.4714	21595.4714	33380.957	3.8837E-14
Residuos	7	4.52857897	0.64693985		
Total	8	21600			

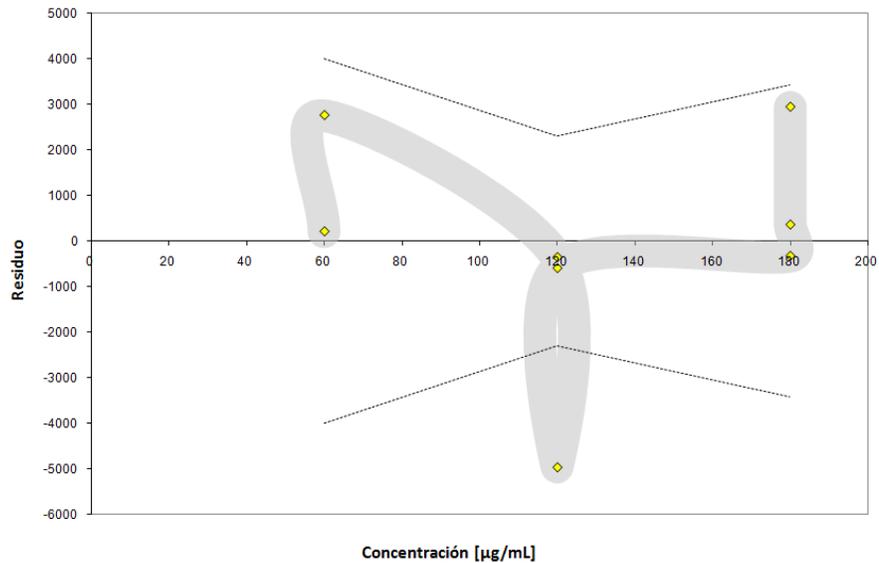


Gráfico 14. Gráfico de residuales para el modelo de linealidad del método del platifilonol.

Tabla 42. Parámetros cromatográficos de la linealidad del método para la platifenona.

Parámetro de desempeño	Resultado obtenido	Criterio de aceptación
n	3	-
b₁	6430.2	-
b₀	11059.2	-
r	0.9995	≥0.999
r²	0.9990	≥0.98
S_{y/x}	929.9	-
IC(β₀)	-4229.0 8631.4	Incluye al cero
IC(β₁)	8859.9 13258.5	Diferente de cero
%CV_{y/x}	1.2%	≤2.0%

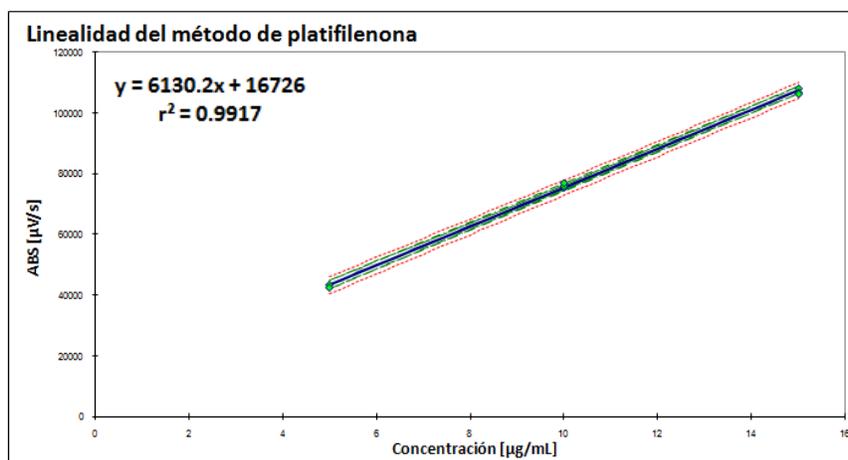


Gráfico 15. Linealidad del método para la platifenona.

Tabla 43. Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método para la platifenona.

Parámetro de desempeño	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β₀)	-1.70847074	0.14639903	-11.6699592	7.6654E-06	-4229.0	8631.4
Ordenada al origen (β₁)	0.00015537	1.8344E-06	84.6941475	8.4233E-12	8859.9	13258.5

Tabla 44. Análisis de varianza de la linealidad del método para la platifilenona.

Parámetro de desempeño	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	149.853762	149.853762	7173.09862	8.4233E-12
Residuos	7	0.14623755	0.02089108		
Total	8	150			

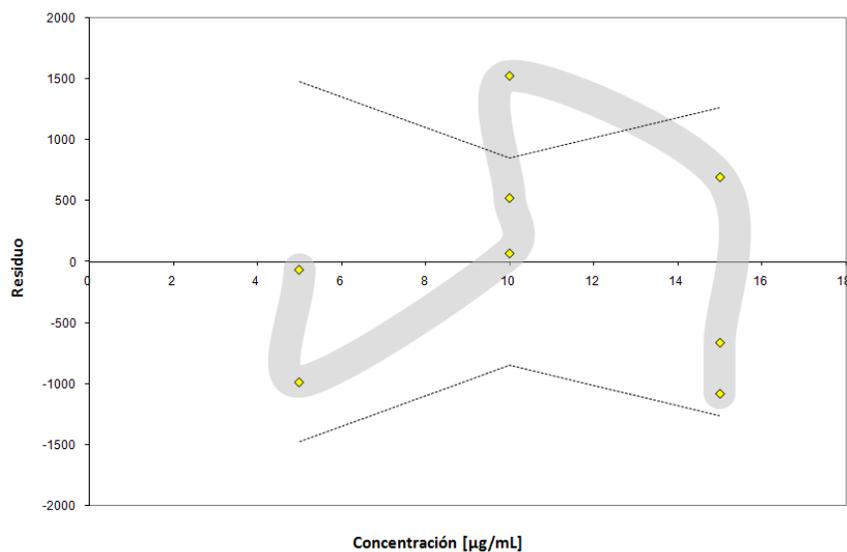


Gráfico 16. Gráfico de residuales para el modelo de linealidad del método de la platifilenona.

La exactitud del método se evaluó mediante el porcentaje de recobro (cantidad recuperada respecto a la adicionada), realizando el análisis del coeficiente de variación de las regresiones ($\%CV_{y/x}$) del porcentaje de recobro y del intervalo de confianza de la media poblacional ($IC_{(\mu)}$). Los resultados obtenidos y los criterios de aceptación se muestran en las **Tablas 45 y 46**.

Tabla 45. Resultados para la exactitud del método.

Matriz vegetal + oregonina				
Nivel de concentración	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Recobro (%)	%CV
1	100	102.4	102.4%	0.96%
	100	100.8	100.8%	
	100	100.7	100.7%	
2	200	202.7	101.4%	0.38%
	200	203.7	101.9%	
	200	202.2	101.1%	
3	300	295.1	98.4%	0.30%
	300	296.8	98.9%	
	300	295.6	98.5%	
ȳ			100.5%	
Matriz vegetal + hirsutanonol				
Nivel de concentración	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Recobro (%)	%CV
1	40	40.6	101.6%	1.09%
	40	40.5	101.4%	
	40	39.8	99.6%	
2	80	83.0	103.7%	0.33%
	80	83.5	104.4%	
	80	83.3	104.1%	
3	120	122.0	101.7%	0.25%
	120	121.4	101.2%	
	120	121.7	101.4%	
ȳ			102.1%	
Matriz vegetal + platifilonol				
Nivel de concentración	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Recobro (%)	%CV
1	60	58.1	96.8%	1.89%
	60	59.5	99.2%	
	60	60.3	100.4%	
2	120	120.1	100.1%	0.60%
	120	118.8	99.0%	
	120	120.0	100.0%	
3	180	180.8	100.4%	0.26%
	180	109.0	100.5%	
	180	181.7	101.0%	
ȳ			99.7%	
Matriz vegetal + platifenona				
Nivel de concentración	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Recobro (%)	%CV
1	5	5.1	101.6%	1.47%
	5	5.2	103.8%	
	5	5.1	100.9%	
2	10	10.2	102.1%	1.12%
	10	10.3	102.8%	
	10	10.4	104.3%	
3	15	15.3	102.0%	0.95%
	15	15.1	100.6%	
	15	15.0	100.2%	
ȳ			101.9%	

Tabla 46. Resultados y parámetros cromatográficos para la exactitud del método.

Compuesto	Parámetro estadístico	Resultado	Criterio de aceptación
oregonina (I)	\bar{y}	100.5%	-
	S	1.5	-
	%CV _{y/x}	1.5%	≤2.0%
	IC _(μ)	99.3 101.6	Incluye al 100
hirsutanonol (II)	\bar{y}	102.1%	-
	S	1.8	-
	%CV _{y/x}	1.7%	≤2.0%
	IC _(μ)	99.8 103.5	Incluye al 100
platifilonol (III)	\bar{y}	99.7%	-
	S	1.3	-
	%CV _{y/x}	1.3%	≤2.0%
	IC _(μ)	98.7 100.7	Incluye al 100
platifilenona (IV)	\bar{y}	101.9%	-
	S	1.2	-
	%CV _{y/x}	1.1%	≤2.0%
	IC _(μ)	99.0 102.8	Incluye al 100

9.3.2.2. Precisión del método

9.3.2.2.1. Repetibilidad

La repetibilidad del método se evaluó mediante el porcentaje de recobro, adicionando a la matriz vegetal de trabajo una cantidad equivalente de la solución **stock B** a una concentración relativa final cercana al 100% de cada compuesto o una concentración que se encuentre dentro del rango lineal de trabajo, por sextuplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 47**, y los parámetros cromatográficos en la **Tabla 48**.

Tabla 47. Resultados para la evaluación de la repetibilidad.

Matriz vegetal + oregonina				
Réplica	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Recobro (%)	%CV
1	200	202.6	101.3%	0.28%
2	200	201.4	100.7%	
3	200	202.9	101.4%	
4	200	203.0	101.5%	
5	200	203.2	101.6%	
6	200	201.6	100.8%	
\bar{y}			101.2%	
Matriz vegetal + hirsutanonol				
Réplica	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Recobro (%)	%CV
1	80	79.3	99.1%	0.18%
2	80	79.1	98.8%	
3	80	79.4	99.2%	
4	80	79.6	99.5%	
5	80	79.4	99.3%	
6	80	79.3	99.2%	
\bar{y}			99.2%	
Matriz vegetal + platifilonol				
Réplica	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Recobro (%)	%CV
1	120	118.3	98.6%	0.75%
2	120	119.7	99.8%	
3	120	119.0	99.1%	
4	120	120.0	100.0%	
5	120	117.7	98.1%	
6	120	120.1	100.0%	
\bar{y}			99.3%	
Matriz vegetal + platifilenona				
Réplica	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Recobro (%)	%CV
1	10	9.9	99.4%	0.70%
2	10	9.9	99.2%	
3	10	10.1	100.7%	
4	10	10.0	99.4%	
5	10	9.9	98.7%	
6	10	10.1	100.7%	
\bar{y}			99.7%	

Tabla 48. Parámetros cromatográficos para la repetibilidad.

Parámetro estadístico	oregonina (I)	hirsutanonol (II)	platifilonol (III)	platifilenona (IV)	Criterio de aceptación
\bar{y}	101.2%	99.2%	99.3%	99.7%	-
S	0.4	0.2	0.8	0.8	-
%CV	0.4%	0.2%	0.8%	0.8%	≤2%
IC _(µ)	99.8 101.6	99.0 101.4	98.4 100.1	98.8 100.5	Incluye al 100

9.3.2.2.2. Precisión del método (precisión intermedia o tolerancia interdía/analista)

La precisión intermedia se realizó analizando por triplicado una muestra de la matriz de trabajo con los compuestos mayoritarios en un nivel equivalente al 100% de la concentración de trabajo, en dos días y por dos analistas, usando la misma solución de referencia, así como los instrumentos y equipos. A partir de las respuestas analíticas se calcularon: las medias aritméticas (\bar{y}), las desviaciones estándar (S) y los coeficientes de variación (CV). El criterio de aceptación es $\%CV \leq 2.0\%$. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 49** y los parámetros cromatográficos en la **Tabla 50**.

Tabla 49. Resultados obtenidos para la precisión interdía.

oregonina		Cantidad recuperada ($\mu\text{g/mL}$)		hirsutanonol		Cantidad recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	
		Analista				Analista	
		I	II			I	II
Día	1	203.45	200.47	Día	1	78.87	78.86
		201.7	201.19			79.32	78.73
		202.08	202.41			78.73	79.00
	2	199.14	200.99		2	78.69	79.01
		200.48	199.75			78.95	79.18
		201.13	199.23			79.10	78.96
Platifilonol		Cantidad recuperada ($\mu\text{g/mL}$)		Platifilenona		Cantidad recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	
		Analista				Analista	
		I	II			I	II
Día	1	120.86	121.98	Día	1	9.95	10.00
		121.23	121.32			9.98	9.97
		120.77	122.17			9.92	10.00
	2	122.30	121.66		2	10.00	10.04
		121.23	120.95			9.95	10.03
		121.40	121.08			9.96	9.98

Tabla 50. Parámetros cromatográficos para la precisión intermedia.

Parámetro estadístico	oregonina (I)	hirsutanonol (II)	platifilonol (III)	platifilenona (IV)	Criterio de aceptación
\bar{y}	201.0	79.0	121.4	10.0	-
S	1.3	0.2	0.5	0.1	-
%CV	0.6%	0.2%	0.4%	0.3%	$\leq 2.0\%$

9.3.3. Estabilidad analítica de la muestra

La estabilidad analítica de las muestras se realizó con muestras independientes a partir de una muestra homogénea, realizando el análisis por triplicado y de forma simultánea para cada una de las siguientes condiciones:

- ✓ Temperatura ambiente en presencia de luz.
- ✓ Temperatura ambiente en ausencia de luz.
- ✓ A 4°C en presencia de luz.
- ✓ A 4°C en ausencia de luz.
- ✓ A 37°C en ausencia de luz.

Los resultados se reportaron en los intervalos de tiempo: 0, 24, 72 horas y 8 días. De las respuestas obtenidas se calculó: las medias aritméticas de análisis inicial (\bar{y}_0), las medias aritméticas para cada condición de almacenaje (\bar{y}_1) y la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial ($|d_i|$). El criterio de aceptación es $|d_i| \leq 2.0\%$. Los resultados se agrupan en las **Tablas 51-55**, y en la **Tabla 56** se observan los resultados finales de las pruebas de estabilidad analítica.

Tabla 51. Resultados para la estabilidad analítica de la muestra a 4°C en ausencia de luz.

oregonina (I)	Concentración inicial (y_0) ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de almacenaje a 4°C en ausencia de luz			Criterio de aceptación
		24 horas (y_1) ($\mu\text{g/mL}$)	72 horas (y_2) ($\mu\text{g/mL}$)	8 días (y_3) ($\mu\text{g/mL}$)	
1	203.3	202.7	199.2	198.1	-
2	202.9	202.8	198.7	198.8	-
3	203.7	203.6	199.5	198.5	-
\bar{y}	203.3	203.0	199.2	198.4	-
$ d_i $		0.1%	2.1%	2.4%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		203.2	199.3	199.0	-
$ d_i $		0.1%	0.1%	0.3%	$\leq 2.0\%$
hirsutanonol (II)					
1	78.6	79.6	79.0	78.5	-
2	79.3	79.1	79.6	78.7	-
3	78.7	79.3	79.1	78.9	-
\bar{y}	78.9	79.3	79.2	78.7	-
$ d_i $		0.6%	0.5%	0.2%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		78.6	78.5	78.4	-
$ d_i $		0.9%	1.0%	0.4%	$\leq 2.0\%$
platifilonol (III)					
1	121.0	121.0	119.8	118.1	-
2	121.5	121.5	118.9	118.3	-
3	120.8	120.8	119.4	118.7	-
\bar{y}	121.1	121.1	119.4	118.4	-
$ d_i $		0.1%	1.5%	2.3%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		121.4	120.9	120.8	-
$ d_i $		0.2%	1.3%	1.9%	$\leq 2.0\%$
platifilenona (IV)					
1	9.9	10.1	10.0	9.9	-
2	10.0	10.1	10.3	10.0	-
3	10.0	10.0	9.7	10.0	-
\bar{y}	10.0	10.1	10.1	10.0	-
$ d_i $		1.1%	1.2%	0.1%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		10.0	9.9	9.8	-
$ d_i $		1.2%	1.6%	0.3%	$\leq 2.0\%$

Tabla 52. Resultados para la estabilidad analítica de la muestra a 4°C en presencia de luz.

oregonina (I)	Concentración inicial (y_0) ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de almacenaje a 4°C en presencia de luz			Criterio de aceptación
		24 horas (y_1) ($\mu\text{g/mL}$)	72 horas (y_2) ($\mu\text{g/mL}$)	8 días (y_3) ($\mu\text{g/mL}$)	
1	203.3	202.0	197.8	196.8	-
2	202.9	202.2	196.5	197.0	-
3	203.7	202.7	197.5	196.9	-
\bar{y}	203.3	202.3	197.2	196.9	-
$ d_i $		0.5%	3.0%	3.2%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		203.2	199.3	199.0	-
$ d_i $		0.5%	1.0%	1.0%	$\leq 2.0\%$
hirsutanonol (II)					
1	78.6	79.5	78.7	78.6	-
2	79.3	79.1	78.7	78.9	-
3	78.7	79.2	78.9	79.0	-
\bar{y}	78.9	79.3	78.8	78.8	-
$ d_i $		0.6%	0.1%	0.1%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		78.6	78.5	78.4	-
$ d_i $		0.9%	0.4%	0.5%	$\leq 2.0\%$
platifilonol (III)					
1	121.0	120.5	117.7	116.6	-
2	121.5	120.3	118.9	116.7	-
3	120.8	120.5	118.6	116.7	-
\bar{y}	121.1	120.4	118.4	116.7	-
$ d_i $		0.6%	2.3%	3.7%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		121.4	120.9	120.8	-
$ d_i $		0.8%	2.0%	3.4%	$\leq 2.0\%$
platifilenona (IV)					
1	9.94	10.1	10.0	10.0	-
2	9.96	10.0	10.0	10.0	-
3	10.01	10.0	9.8	9.9	-
\bar{y}	9.97	10.0	9.9	10.0	-
$ d_i $		0.6%	0.5%	0.2%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		10.0	9.9	9.8	-
$ d_i $		0.7%	0.1%	1.2%	$\leq 2.0\%$

Tabla 53. Resultados para la estabilidad analítica de la muestra a temperatura ambiente en ausencia de luz.

oregonina (I)	Concentración inicial (y_0) ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de almacenaje a temperatura ambiente en ausencia de luz			Criterio de aceptación
		24 horas (y_1) ($\mu\text{g/mL}$)	72 horas (y_2) ($\mu\text{g/mL}$)	8 días (y_3) ($\mu\text{g/mL}$)	
1	203.3	203.0	190.2	181.2	-
2	202.9	202.1	191.6	180.3	-
3	203.7	203.4	190.7	179.9	-
\bar{y}	203.3	202.8	190.9	180.5	-
$ d_i $		0.2%	6.2%	11.4%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		203.2	199.3	199.0	-
$ d_i $		0.2%	4.2%	9.2%	$\leq 2.0\%$
hirsutanonol (II)					
1	78.6	79.9	79.6	75.7	-
2	79.3	79.2	78.9	74.9	-
3	78.7	79.0	77.8	75.5	-
\bar{y}	78.9	79.4	78.8	75.3	-
$ d_i $		0.6%	0.1%	4.4%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		78.6	78.5	78.4	-
$ d_i $		1.0%	0.4%	3.8%	$\leq 2.0\%$
platifilonol (III)					
1	121.0	121.7	116.6	117.1	-
2	121.5	122.3	116.6	116.3	-
3	120.8	121.8	117.4	115.9	-
\bar{y}	121.1	121.9	116.8	116.4	-
$ d_i $		0.7%	3.6%	4.0%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		121.4	120.9	120.8	-
$ d_i $		0.5%	3.4%	3.6%	$\leq 2.0\%$
platifilenona (IV)					
1	9.9	10.1	10.0	10.0	-
2	10.0	10.1	10.0	10.0	-
3	10.01	10.2	10.1	10.0	-
\bar{y}	10.0	10.1	10.0	10.0	-
$ d_i $		1.7%	0.7%	0.2%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		10.0	9.9	9.8	-
$ d_i $		1.8%	1.1%	1.5%	$\leq 2.0\%$

Tabla 54. Resultados para la estabilidad analítica de la muestra a temperatura ambiente en presencia de luz.

oregonina (I)	Concentración inicial (y_0) ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de almacenaje a temperatura ambiente en presencia de luz			Criterio de aceptación
		24 horas (y_1) ($\mu\text{g/mL}$)	72 horas (y_2) ($\mu\text{g/mL}$)	8 días (y_3) ($\mu\text{g/mL}$)	
1	203.3	201.8	186.8	176.0	-
2	202.9	200.9	186.7	177.3	-
3	203.7	202.3	185.2	178.0	-
\bar{y}	203.3	201.7	186.2	177.1	-
$ d_i $		0.8%	8.5%	13.1%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		203.2	199.3	199.0	-
$ d_i $		0.8%	6.5%	10.9%	$\leq 2.0\%$
hirsutanonol (II)					
1	78.6	78.8	78.4	75.1	-
2	79.3	80.2	78.0	75.8	-
3	78.7	78.7	78.0	75.7	-
\bar{y}	78.9	79.3	78.1	75.5	-
$ d_i $		0.5%	0.9%	4.2%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		78.6	78.5	78.4	-
$ d_i $		0.9%	0.4%	3.6%	$\leq 2.0\%$
platifilonol (III)					
1	121.0	120.6	113.6	112.2	-
2	121.5	122.1	114.0	112.7	-
3	120.8	121.1	114.4	113.0	-
\bar{y}	121.1	121.3	114.0	112.6	-
$ d_i $		0.1%	6.0%	7.1%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		121.4	120.9	120.8	-
$ d_i $		0.1%	5.7%	6.8%	$\leq 2.0\%$
platifilenona (IV)					
1	9.9	10.0	10.0	9.9	-
2	10.0	10.0	9.9	9.9	-
3	10.0	9.9	9.9	10.0	-
\bar{y}	10.0	10.0	9.9	9.9	-
$ d_i $		0.1%	0.5%	0.4%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		10.0	9.9	9.8	-
$ d_i $		0.1%	0.1%	1.0%	$\leq 2.0\%$

Tabla 55. Resultados para la estabilidad analítica de la muestra a 37°C en ausencia de luz.

oregonina (I)	Concentración inicial (y_0) ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de almacenaje a 37°C en ausencia de luz			Criterio de aceptación
		24 horas (y_1) ($\mu\text{g/mL}$)	72 horas (y_2) ($\mu\text{g/mL}$)	8 días (y_3) ($\mu\text{g/mL}$)	
1	203.3	200.1	177.2	171.5	-
2	202.9	198.8	176.4	171.0	-
3	203.7	199.3	175.6	172.6	-
\bar{y}	203.3	199.4	176.4	171.6	-
$ d_i $		1.9%	13.4%	15.9%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		203.2	199.3	199.0	-
$ d_i $		1.9%	11.4%	13.7%	$\leq 2.0\%$
hirsutanonol (II)					
1	78.6	78.9	77.0	74.6	-
2	79.3	78.7	77.1	74.3	-
3	78.7	79.6	77.1	74.2	-
\bar{y}	78.9	79.1	77.1	74.3	-
$ d_i $		0.3%	2.2%	5.7%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		78.6	78.5	78.4	-
$ d_i $		0.7%	1.7%	5.1%	$\leq 2.0\%$
platifilonol (III)					
1	121.0	120.0	110.7	107.9	-
2	121.5	120.6	110.4	107.4	-
3	120.8	120.8	111.2	108.0	-
\bar{y}	121.1	120.5	110.8	107.8	-
$ d_i $		0.6%	8.8%	11.1%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		121.4	120.9	120.8	-
$ d_i $		0.8%	8.4%	10.8%	$\leq 2.0\%$
platifilenona (IV)					
1	9.9	10.0	9.8	9.5	-
2	10.0	10.0	9.7	9.5	-
3	10.0	10.0	9.8	9.5	-
\bar{y}	10.0	10.0	9.8	9.5	-
$ d_i $		0.5%	2.0%	4.8%	$\leq 2.0\%$
\bar{y} fresco		10.0	9.9	9.8	-
$ d_i $		0.5%	1.6%	3.4%	$\leq 2.0\%$

Tabla 56. Resultados finales para las pruebas de estabilidad analítica.

Compuesto a las 24 hrs.	4°C en ausencia de luz	4°C en presencia de luz	Temperatura ambiente en ausencia de luz	Temperatura ambiente en presencia de luz	37°C en ausencia de luz
oregonina (I)	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE
hirsutanonol (II)	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE
platifilonol (III)	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE
platifilenona (IV)	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE
Compuesto a las 72 hrs.	4°C en ausencia de luz	4°C en presencia de luz	Temperatura ambiente en ausencia de luz	Temperatura ambiente en presencia de luz	37°C en ausencia de luz
oregonina (I)	NO ESTABLE	NO ESTABLE	NO ESTABLE	NO ESTABLE	NO ESTABLE
hirsutanonol (II)	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE	NO ESTABLE
platifilonol (III)	ESTABLE	NO ESTABLE	NO ESTABLE	NO ESTABLE	NO ESTABLE
platifilenona (IV)	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE	NO ESTABLE
Compuesto a los 7 días	4°C en ausencia de luz	4°C en presencia de luz	Temperatura ambiente en ausencia de luz	Temperatura ambiente en presencia de luz	37°C en ausencia de luz
oregonina (I)	NO ESTABLE	NO ESTABLE	NO ESTABLE	NO ESTABLE	NO ESTABLE
hirsutanonol (II)	ESTABLE	ESTABLE	NO ESTABLE	NO ESTABLE	NO ESTABLE
platifilonol (III)	NO ESTABLE	NO ESTABLE	NO ESTABLE	NO ESTABLE	NO ESTABLE
platifilenona (IV)	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE	ESTABLE	NO ESTABLE

Partiendo de los resultados mostrados en la **Tabla 56**, el compuesto oregonina (I) mostró ser el compuesto más inestable de los cuatro compuestos marcadores, esto principalmente en cuanto al tiempo en el que se desarrollaron las cuatro condiciones evaluadas después de las 24 horas y por las condiciones de análisis realizadas. No se conoce el mecanismo de su descomposición, sin embargo los picos cromatográficos mostraron un ensanchamiento del pico característico y la aparición de un nuevo pico cromatográfico. En cuanto al compuesto platifilonol (III), éste fue el segundo compuesto inestable, siendo el tiempo de prueba (después de las 24 hrs.) y todas las condiciones evaluadas los factores causales de la inestabilidad; los compuestos hirsutanonol (II) y platifilenona (IV) fueron los compuestos más estables, ya que en su evaluación y seguimiento cromatográfico no mostraron inestabilidad hasta después de las 72 hrs en condiciones ambientales en ausencia y presencia de luz, y bajo una temperatura de 37 °C, esto por la aparición de un pico cromatográfico a un costado del pico de interés.

9.3.4. Cuantificación de los compuestos mayoritarios en los componentes de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*

Se cuantificaron las cantidades correspondientes a los compuestos mayoritarios contenidos en la corteza externa y en la madera del “aile”, con el método descrito anteriormente por triplicado.

Las respuestas analíticas correspondientes a cada compuesto fueron registradas e interpoladas en la curva de calibración de la **Linealidad del sistema (Apartado 9.3.1.3)**, de modo que se calculó la cantidad de cada compuesto contenido en las respectivas partes de la planta medicinal, interpolando cada valor de las tres lecturas efectuadas para cada muestra. El valor reportado corresponde al promedio de las mismas con su desviación estándar.

Los resultados fueron calculados mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}_{\text{mat vegetal}}} \right) = \left(\frac{\text{Lectura ABC} \left(\frac{\mu\text{V}}{\text{s}} \right) - \beta_0}{\beta_1} * \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \right) * \left(\frac{\text{factor de dilución}}{\text{mg muestra}} \right) * 100 \text{ mg mat vegetal}$$

Donde:

Lectura ABC ($\mu\text{V/s}$): Respuesta analítica promedio de la muestra.

β_0 : ordenada al origen de la linealidad del sistema.

β_1 . Pendiente de la linealidad del sistema.

Los resultados obtenidos para la cuantificación de los compuestos mayoritarios se muestran en la **Tabla 57** y en el **Gráfico 17**.

Tabla 57. Resultados de la cuantificación de metabolitos en los componentes de la corteza de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*.

Componente del árbol	oregonina	hirsutanonol	platifilonol	platifilenona	
Corteza	3.53	0.70	1.24	0.12	
	3.52	0.70	1.24	0.12	
	3.58	0.70	1.24	0.12	
	mg/g	3.52	0.70	1.24	0.12
	S	0.01	0.002	0.004	0.001
%CV	0.2	0.2	0.3	0.5	
Corteza + madera	0.11	0.05	0.07	0.01	
	0.11	0.05	0.07	0.01	
	0.11	0.05	0.07	0.01	
	mg/g	0.11	0.05	0.07	0.01
	S	0.0006	0.0001	0.0001	3.14889E-05
%CV	0.5	0.2	0.2	0.5	

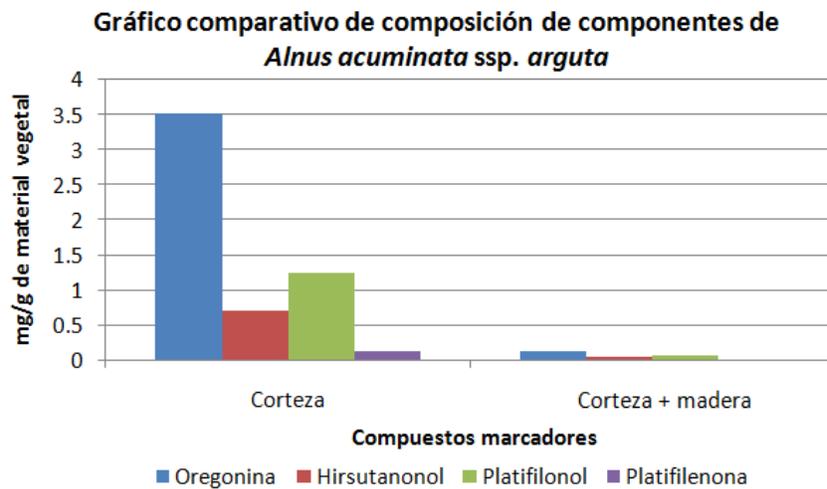


Gráfico 17. Gráfico comparativo del contenido metabólico de los diferentes componentes de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*.

Los resultados obtenidos de la cuantificación demuestran que el extracto de MeOH de la corteza de la especie vegetal contiene una cantidad mayor de compuestos marcadores, principalmente oregonina (I) y platifilonol (III) en comparación con el extracto de MeOH de la mezcla de la corteza y madera que contienen a los cuatro compuestos marcadores pero en menor cantidad. Por esta razón la colecta de corteza debe realizarse de manera racional y programada, y en nula medida en combinación con la madera.

9.3.5. Pruebas de actividad antiinflamatoria

Para evaluar la capacidad antiinflamatoria de los componentes del árbol de *Alnus acuminata* (corteza y mezcla de corteza y madera) se llevó a cabo un ensayo *in-vitro* con la enzima COX-II y un ensayo *in-vivo* de inflamación de oreja de ratón inducido con TPA no reportados en trabajos previos con el fin de evaluar la infusión de la corteza sola y de la infusión de la mezcla de corteza y madera.

9.3.5.1. Ensayo preliminar *in-vitro* de la actividad antiinflamatoria utilizando la enzima COX-II

Se determinó la CI_{50} de los extractos acuosos de la corteza y de la mezcla de corteza con madera, utilizando una concentración de los extractos acuosos de 100 $\mu\text{g/mL}$ para ambos casos, así como un fármaco inhibidor selectivo de la enzima COX-II (Celecoxib) con el fin de determinar y comparar la actividad antiinflamatoria con la del fármaco de referencia. Los resultados se muestran en la **Tabla 58**.

Tabla 58. Resultados preliminares de la capacidad antiinflamatoria en el ensayo *in-vitro* de la enzima COX-II.

Componente	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Corteza	83
Corteza + madera	113
Celecoxib (COX-II)	0.75

Este modelo *in-vitro* de actividad antiinflamatoria de la enzima COX-II permitió determinar de forma preliminar la capacidad inhibitoria de los extractos acuosos de la corteza y de la mezcla de la corteza con la madera en la isoenzima COX-II, esto con base en el valor obtenido de la CI_{50} . Se utilizó como inhibidor potente y selectivo de COX-II el Celecoxib, con el cual se compararon los valores de las CI_{50} obtenidos de los extractos acuosos a través de la interpolación de la absorbancia registrada en una curva de calibración previamente obtenida en un rango de concentración entre 50-150 $\mu\text{g/mL}$. En este experimento se determinó que los extractos acuosos de las drogas vegetales presentaron capacidad inhibitoria de la isoforma COX-II en el rango lineal propuesto, observándose que el extracto acuoso de la corteza presentó mayor inhibición de la isoforma COX-II con una CI_{50} de **83 $\mu\text{g/mL}$** , en comparación con el extracto acuoso de la mezcla de corteza y madera, con una CI_{50} de **113 $\mu\text{g/mL}$** . Estos resultados sugieren que el efecto

inhibitorio de ambos extractos acuosos a una concentración de 100 µg/mL no fue significativo a comparación del efecto del inhibidor selectivo Celecoxib, de modo que al aumentar la concentración de los extractos se esperaba que el efecto anti inflamatorio fuese mayor o similar al fármaco específico de prueba. Al observarse una mayor concentración de compuestos tipo diarilheptanoide en el extracto de la corteza de *Alnus acuminata ssp. arguta* de acuerdo a los resultados de cuantificación obtenidos para los compuestos marcadores (**Apartado 9.3.4.**), esto sugiere que son los principales responsables del efecto antiinflamatorio observado, en comparación con el extracto de la mezcla de la corteza y madera, donde el efecto antiinflamatorio fue menor.

9.3.5.2. Ensayo *in-vivo* mediante un modelo de inflamación de oreja de ratón inducido con TPA.

Los resultados obtenidos del modelo *in-vivo* se muestran en la **Tabla 59**:

Tabla 59. Resultados de la actividad anti inflamatoria utilizando el modelo *in-vivo* de inflamación de oreja inducido por TPA.

Componente	Control (C)		Tratado con extracto (T)		Resultado contra la media del control	
	Peso de oreja de ratón (mg)	% de inhibición	% de inhibición			
Control (TPA)	9.7	25.1	15.4	-0.22	-	
	9.8	27.1	17.3	-12.58		
	9.7	23.1	13.4	12.80		
Corteza	9.3	23.9	14.6	4.99	17.57 ± 15.53%	
	9.8	19.8	10.0	34.92		
	9.3	22.7	13.4	12.80		
Corteza + madera	9.3	22.6	13.3	13.45	13.67 ± 2.93%	
	9.6	23.3	13.7	10.85		
	8.1	20.9	12.8	16.70		

Este modelo *in-vivo* de inflamación inducida por TPA se caracteriza por la irritación de la piel y generación de inflamación local, cuya característica temprana es el engrosamiento de la oreja generado por la infiltración de mastocitos con la liberación de mediadores que incrementan la permeabilidad vascular y la afluencia de neutrófilos⁷⁰, hasta la formación del edema e inflamación dentro de la dermis⁷¹. Se realizó la aplicación de una solución de TPA (0.25 mg/mL) disuelto en una mezcla de agua:acetona (1:1) en las orejas de cinco ratones CD-1 (previamente anestesiados) para inducir por dos horas la formación del edema, tiempo en el cual posteriormente se realizó la aplicación de los extractos acuosos de la corteza (3 orejas) y de la mezcla de la corteza y madera (3 orejas) a una concentración de 1 mol/oreja, considerando 3 orejas como grupo control y determinando de esta manera el peso de la oreja después del tratamiento con los extractos de

⁷⁰ Rao *et al.*, 1993.

⁷¹ De Vry *et al.*, 2005.

prueba y el porcentaje de disminución del edema (porcentaje de inhibición). Los resultados obtenidos en ambos extractos no difirieron estadísticamente entre sí de manera significativa, observándose un mayor porcentaje de inhibición de edema en el extracto acuoso de la corteza de **17.57 ± 15.53%** y un porcentaje de **13.67 ± 2.93%** en el extracto de la mezcla de corteza y madera. Esta variabilidad pudo generarse al existir diferente grado de absorción de los extractos, siendo diferente entre una y otra oreja utilizadas; por el tipo de aplicación (tópica) de los extractos, en la cual al utilizarse un volumen muy pequeño (20 µL) pudo generar errores en su manejo, transporte o aplicación; por la posible influencia del vehículo (acetona) en la solubilidad del extracto y aplicación en el tejido, entre otras razones. La observación de una mayor concentración de diarilheptanoides en el extracto de la corteza de la planta medicinal sugiere que éstos son los principales compuestos responsables del efecto inhibitorio en la formación del edema, en comparación con el efecto inhibitorio observado del extracto de la mezcla de corteza y madera, el cual fue menor.

10. CONCLUSIONES

Los cuatro compuestos aislados en este trabajo, oregonina (I), hirsutanonol (II), platifilonol (III) y platifilenona (IV) presentaron características adecuadas para considerarse como los marcadores de la especie vegetal *Alnus acuminata* ssp. *arguta*. El método de aislamiento permitió la obtención del compuesto III, el cual no había sido identificado previamente en la especie.

El método desarrollado y validado para realizar la cuantificación de los compuestos marcadores en las diferentes partes del árbol (corteza y madera) demostró ser adecuado, lineal, exacto y preciso con base en los manuales vigentes de validación.

Las pruebas de estabilidad analítica demostraron que los compuestos hirsutanonol (II) y platifilenona (IV) fueron los productos más estables, a comparación de los compuestos platifilonol (III) y la oregonina (I), los cuales son inestables, fotolábiles y termosensibles, por lo que se recomienda su manejo y uso en ausencia de luz y control de temperatura.

El método analítico de cuantificación utilizado permitió detectar cantidades significativas de los cuatro compuestos marcadores en la corteza de la especie vegetal, en comparación con la mezcla evaluada de corteza y madera. Asimismo, este método demostró que los compuestos mayoritarios fueron la oregonina (I) y platifilonol (II) en los extractos de MeOH de la corteza y en la mezcla de la corteza y la madera, lo que comprueba que la droga vegetal de uso terapéutico del árbol de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* consiste únicamente en la corteza. Estas consideraciones confirman los resultados obtenidos en los ensayos farmacológicos, los cuales permitieron comprobar la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de la corteza de la planta, ya que se observó un mayor efecto de inhibición de inflamación en el modelo *in-vivo* de edema de oreja de rata y una mayor capacidad de inhibición de la isoforma COX-II en el modelo *in-vitro* con respecto de la mezcla de corteza con madera.

La colecta indiscriminada de la corteza y la madera por parte de los colectores de la droga pone en riesgo la preservación de la especie vegetal *Alnus acuminata* ssp. *arguta*.

11. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo justifican el desarrollo de un método de cuantificación de los compuestos marcadores aislados en distintas colectas de la corteza en diferentes puntos de México y en diferentes condiciones climáticas, ambientales, etc., así como la realización de un perfil completo de actividad antiinflamatoria mediante un modelo *in-vitro* con las enzimas COX (I y II) de los compuestos puros y diferentes extractos de la corteza sometidos a diferentes métodos de extracción (decocción, digestión, maceración, etc.).

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, M.I., Rovelo, R., Verjan, J.G., Illescas, O., Baeza A.E., De La Fuente, M., Ávila, I., Navarrete, A., Anti-inflammatory activities, triterpenoids and diarylheptanoids of *Alnus acuminata* ssp. *arguta*, *Pharmaceutical Biology*, **49**(11):1052-1057 (2011).
- Álvarez, V.H., Estudio forestal del jaúl *Alnus jorullensis* (HBK) en Costa Rica, pág. 96 (1956).
- Aoki, T., Ohta S., Suga T., Triterpenoids, diarylheptanoids and their glycosides in the flowers of *Alnus* species, *Phytochemistry*, **29**:3611-3614 (1990).
- Brand, S., Holscher, D., Schierhorn, A., Svatos, A., Schroder, J., Schneider, B., A type III polyketide synthase from *Wachendorfia thyrsiflora* and its role in diarylheptanoid and phenylphenalenone biosynthesis, *Planta*, **224**:413–428 (2006).
- Chung, M.Y., Rho, M.C., Lee, S.W., Park, H.R., Kim, K., Lee, I.A., Kim, D.H., Jeune, K.H., Lee, H.S., Kim, Y.K., Inhibition of diacylglycerol acyltransferase by betulinic acid from *Alnus hirsuta*, *Planta Medica*, **72**:267-269 (2006).
- Claeson, P., Pongprayoon, U., Sematong, T., Tuchinda, P., Reutrakul, V., Soontornsaratune, P., Taylor, W.C., Non-phenolic linear diarylheptanoids from *Curcuma xanthorrhiza*. A novel type of topical anti-inflammatory agents. Structure-activity relationship, *Planta Medica*, **62**:236-240 (1996).
- Cragg, G.M., Newman, D.J., Snader, K.M., Natural products in drug discovery and development, *Journal of Natural Products*, **60**:52-60 (1997).
- Dadáková, E., Vrchotová, N., Ďriska, J., Content of selected biologically active compounds in tea infusions of widely used European medicinal plants, *Journal of Agrobiology*, **27**:27-34 (2010).
- De Vry, C.G., Valdez, M., Lazarov, M., Muhr, E., Buelow, R., Fong, T.S., Topical application of a novel immunomodulatory peptide, RDP58, reduces skin inflammation in the phorbol ester-induced dermatitis model, *Journal of Investigative Dermatology*, **125**(3):473-481 (2005).
- De la Cruz, M., *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, Manuscrito azteca. 2a. traducción latina de Juan Badiano, pág. 62 (1552).
- Della, L.R., Tubaro, A., Sosa, S., Becker, H., Saar, O., The Role of Triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* Flowers, *Planta medica*, **60**:516-520 (1994).
- Dewick, P.M., Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach, 3ra. Edición, p. 60 (2009).
- Dewick, P.M., Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach, 3ra. Edición, p. 137 (2009).
- Dewick, P.M., Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach, 3ra. Edición, p. 136-149 (2009).
- Eun-Kyung, K., Ha-na, C., Hye-Young, J., Sun-Eun, C., Oregonin from the stems and leaves of Korean *Alnus* species (Betulaceae), *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **7**(4):234-238 (2015).
- Farmacopea de los Estados Unidos de América, Formulario Nacional, Compendio de normas oficiales, USP 37 – NF 32, pp. 1440-1447 (2014).
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Comisión Permanente de la Farmacopea, tomo II, 11ª edición, Secretaría de Salud, México, pp. 2423-2435 (2014).
- Fischer, S.M., Baldwin, J.K., Jasheway, D.W., Patrick, K.E., Cameron, G.S., Phorbol ester induction of 8-lipoxygenase in inbred SENCAR (SSIN) but not C57BL/6J mice correlated with hyperplasia, edema, and oxidant generation but not ornithine decarboxylase induction, *Cancer Research*, **48**(3):658-664 (1988).
- Fuchino, H., Konishi, S., Satoh, T., Yagi, A., Saitsu, K., Tatsumi, T., Tanaka, N., Chemical Evaluation of *Betula* Species in Japan II, Constituents of *Betula platyphylla* var. *japonica*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **44**:1033–1038 (1996).

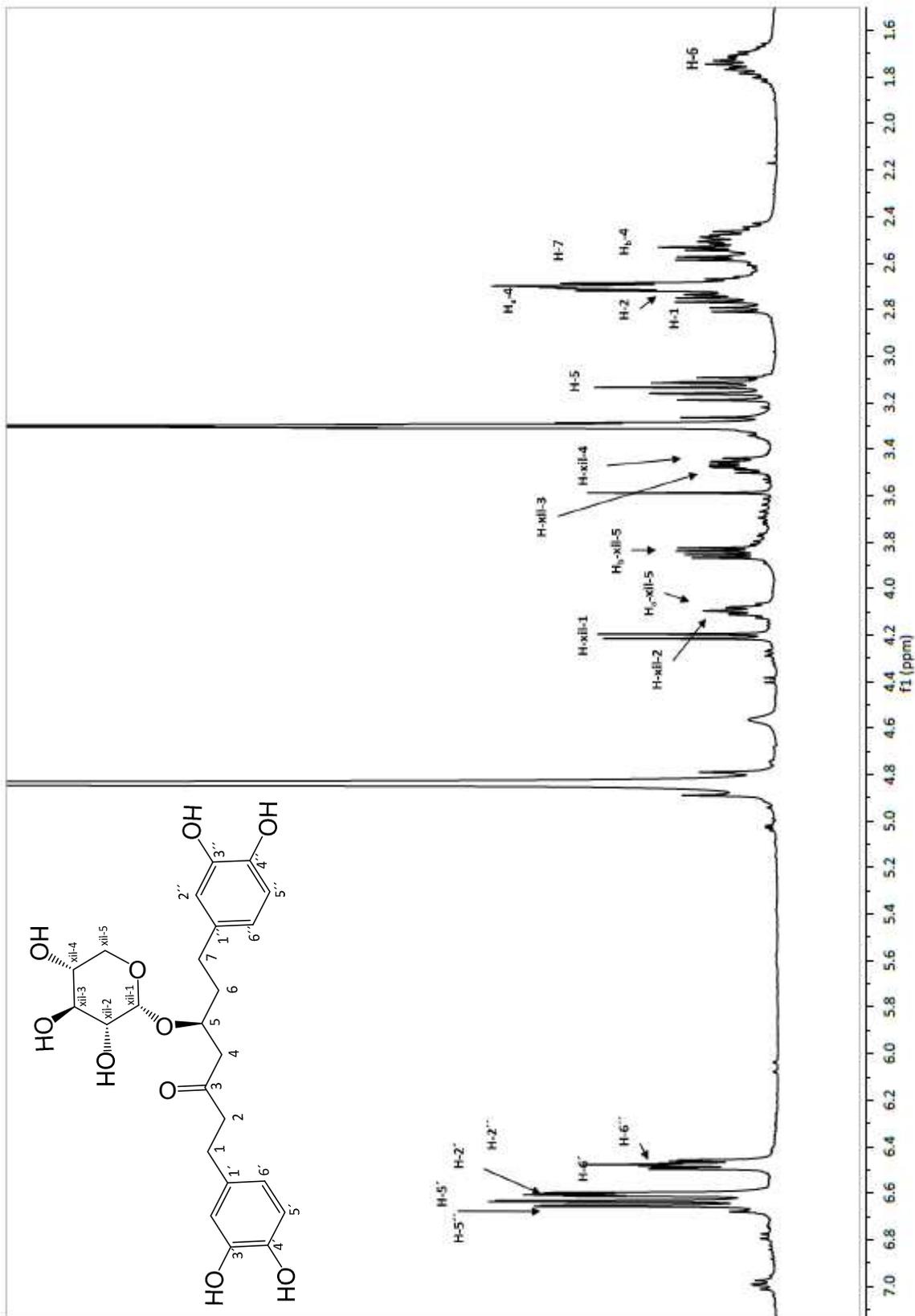
- Gabor, M., Models of acute inflammation in the ear, *Methods in molecular biology*, **225**:129-137 (2003).
- Gonzalez-Laredo, R.F., Chen, J., Karchesy, Y.M., Karchesy, J.J., Four New Diarylheptanoids from *Alnus rubra* bark, *Natural Products Letters*, **13**:75–80 (1999).
- Haining, L., Naturally occurring diarylheptanoids – a supplementary version, *Records of Natural Products*, **6**:321-333 (2011).
- Han, J.M., Lee, W.S., Kim, J.R., Son, J., Nam, K.H., Choi, S.C., Effects of diarylheptanoids on the tumor necrosis factor- α induced expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**:9457–64 (2007).
- Hara, H., Sukamoto, T., Ohtaka, H., Abe, K., Tatum, Y., Saito, Y., Suzuki, A., Tsukamoto, G., Effects of baicalein and alpha-tocopherol on lipid peroxidation, free radical scavenging activity and 12-O-tetradecanoylphorbol acetate-induced ear edema, *European Journal of Pharmacology*, **221**:193-198 (1992).
- Iason, G.R.; Palo, R.T., Effects of birch phenolics on grazing and browsing mammal: a comparison of hares, *Journal of Chemical Ecology*, **17**:1733-1743 (1991).
- Información sistemática integral taxonómica, Subcomité de la Casa Blanca Y Ecosistemas Dinámicos, EUA (biblioteca en línea), versión del 29 de febrero de 2016, <http://www.itis.gov>, citado: diciembre, 2015.
- Jiang, G.L., Tanaka, T., Inutsuka, C., Kouno, I., Alkaloids, Diarylheptanoid and Naphthalene Carboxylic Acid Ester from *Rhoiptelea chiliantha*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **49**:737–740 (2001).
- Jiang Z. H., Tanaka T., Kirata H., Fukuoka R., Kuono I., Three diarylheptanoids from *Rhoiptelea chiliantha*, *Phytochemistry*, **43**:1049–1054 (1996).
- Jin, W.Y., Cai, X.F., Na, M.K., Lee, J.J., Bae, K.H., Diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* Inhibit the NF κ B activation and NO and TNF α production, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **30**:810–3 (2007) (a).
- Jin, W.Y., Cai, X.F., Na, M., Lee, J.J., Bae, K., Triterpenoids and diarylheptanoids from *Alnus hirsute* inhibit HIF-1 in AGS cells, *Archives of Pharmaceutical Research*, **30**(4):412-418 (2007) (b).
- Jutiviboonsuk, A., Zhang, H., Kondratyuk, T., Herunsalee, A., Chaukul, W., Pezzuto, J., Bunyapraphatsara, N., Isolation and characterization of cancer chemopreventive compounds from *Barringtonia maunwongyathiae*, *Pharmaceutical Biology*, **45**:185-194 (2007).
- Kazuhito, O., Mmatsutake, H., Kozo, H., Takayuki, S., Triterpenes from the leaves of *Parsonsia laevigata*, *Phytochemistry*, **26**:783-795 (1987).
- Kim, D.K., Nam, Y.I., Kim, J.W., Shin, T.Y., Lim, J.P., Pentacyclic triterpenoids from *Ilex macropoda*, *Archives of Pharmaceutical Research*, **25**:617-620 (2002).
- Kim, H.M., Nitric oxide and prostaglandin E2 synthesis inhibitory activities of diarylheptanoids from the barks of *Alnus japonica Steudel*, *Archives of Pharmaceutical Research*, **28**:177-179 (2005).
- Kim, J.H., Lee, K.W., Lee, M.W., Lee, H.J., Kim, S.H., Surh, Y.J., Hirsutenone inhibits phorbol ester-induced upregulation of COX-2 and MMP-9 in cultured human mammary epithelial cells: NF-kappaB as a potential molecular target. *FEBS Letters*, **580**:385–392 (2006).
- Kim SH, Park JH, Kim TB, Lee H., Lee KY, Kim YC, Sung SH, Inhibition of antigen-induced degranulation by aril compounds isolated from the bark of *Betula platyphylla* in RBL-2H3 cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **20**:2824-2827 (2010).
- Kuroyanagi, M., Shimomae, M., Nagashima, Y., Muto, N., Okuda, T., Kawahara, N., Nakane, T., Sano, T., New diarylheptanoids from *Alnus japonica* and their antioxidative activity, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **53** (12):1519-1523 (2005).

- Larsen, G. L. & Henson, P. M. Mediators of inflammation. *Annual Review Immunology*, **1**:335–359 (1983).
- Lee, K.S., Li, G., Lee, C.S., Woo, M.H., Lee, S.H., Jhang, Y.D., Son, J.K., Cytotoxic Diarylheptanoids from the Root of *Juglans mandshurica*, *Journal of Natural Products*, **65**:1707–1708 (2002).
- Lee, M.W., Tanaka, T., Nonaka, G., Nishioka, I., Hirsunin, an ellagitannin with a diarylheptanoid moiety, from *Alnus hirsuta* var. *Microphylla*, *Phytochemistry*, **31**:967-970 (1992).
- Lee, M.W., Park, M.S., Jyeong, D.W., Kim, K.H., Kim, H.H., Toh, S.H., Diarylheptanoids from the leaves of *Alnus hirsuta* Turcz, *Archives of Pharmaceutical Research*, **23**:50–53 (2000) (a).
- Lee, M.W., Kim, J.H., Jeong, D.W., Ahn, K.H., Toh, S.H., Surth, Y.J., Inhibition of cyclooxygenase 2 expression by diarylheptanoids from the bark of *Alnus hirsuta* var. *Sibirica*, *Biology and Pharmaceutical Bulletin*, **23**:517–8 (2000) (b).
- Lee, M.W., Kim, N.Y., Park, M.S., Ahn, K.H., Toh, S.H., Hahn, D.R., Diarylheptanoids with *in vitro* inducible nitric oxide synthesis inhibitory activity from *Alnus hirsuta*, *Planta Medica.*, **66**:551–3 (2000) (c).
- Lee, S.S., Chen, S.C., Chen, C.K., Chen, C.H., Kuo, C.M., Chemical constituents from *Alnus formosana* Burk. II. Polar constituents from the leaves, *Journal of Natural Products*, **1**:461–464 (2006).
- Lee, M., Song, J.Y., Chin, Y.W., Sung, S.H., Anti-adipogenic diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* f. *sibirica* on 3T3-L1 cells. *Bioorganic Medical Chemistry Letters*, **23**:2069–2073 (2013).
- La lista de plantas. Una lista trabajada de todas las especies de plantas (biblioteca en línea). Versión 1.1, septiembre de 2013. <http://www.theplantlist.org>. Citado: febrero de 2016.
- Martínez J., *La Flora de Veracruz*. México: Ed. El Ateneo, Fascículo, **20**:128–136 (1984).
- Martínez, M., *Las plantas medicinales de México* (6ª edición), México: Ediciones Botas.
- Masayasu, N., Takashi, T., Takashi, K., Biarylheptanoids and other constituents from wood of *Alnus japonica*, *Phytochemistry*, **20**(5):1097-1104 (1981).
- Matsunaga, S., Tanaka, R., Akagi, M., Triterpenoids from *Euphorbia maculate*, *Phytochemistry*, **27**:535-537 (1988).
- Middleton, P., Stewart, F., Al-Qahtani, S., Egan, P., Rourke, C., Abdulrahman, A., Antioxidant, antibacterial activities and general toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*. *Iran Journal of Pharmaceutical Research*, **2**:81-6 (2005).
- Min-Won, L., Jung-Hwan, K., Dong-Wood, J., Kyoung-Hwan, A., Sang-Hak, T., Young-Jonh, S., Inhibition of cyclooxygenase-2. Expression by diarylheptanoids from the bark of *Alnus hirsuta* var. *sibirica*, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **23**:517-518 (2000).
- Mitchell, J.A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R.J., Vane, J.R., Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase, *Proceedings of the National Academy of Science*, **90**:11693–7 (1993).
- Miyamoto, N., Differences in spatial anticorrelation between four sun-populations of *Alnus trabeculosa* Hand.-Mazz (Betulaceae), **89**:273-279 (2002).
- Morihara, M., Sakurai, N., Inoue, T., Kawai, K., Nagai, M., Two Novel Diarylheptanoids from *Myrica gale* var. *tomentosa* and Absolute Structure of Plane-Chiral Galeon, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **45**:820–823 (1997).
- Munde, T., Brand, S., Hidalgo, W., Maddula, R.K., Svatos, A., Schneider, B., Biosynthesis of tetraoxygenated phenylphenalenones in *Wachendorfia thyrsiflora*, *Phytochemistry*, **91**:165–176 (2013).

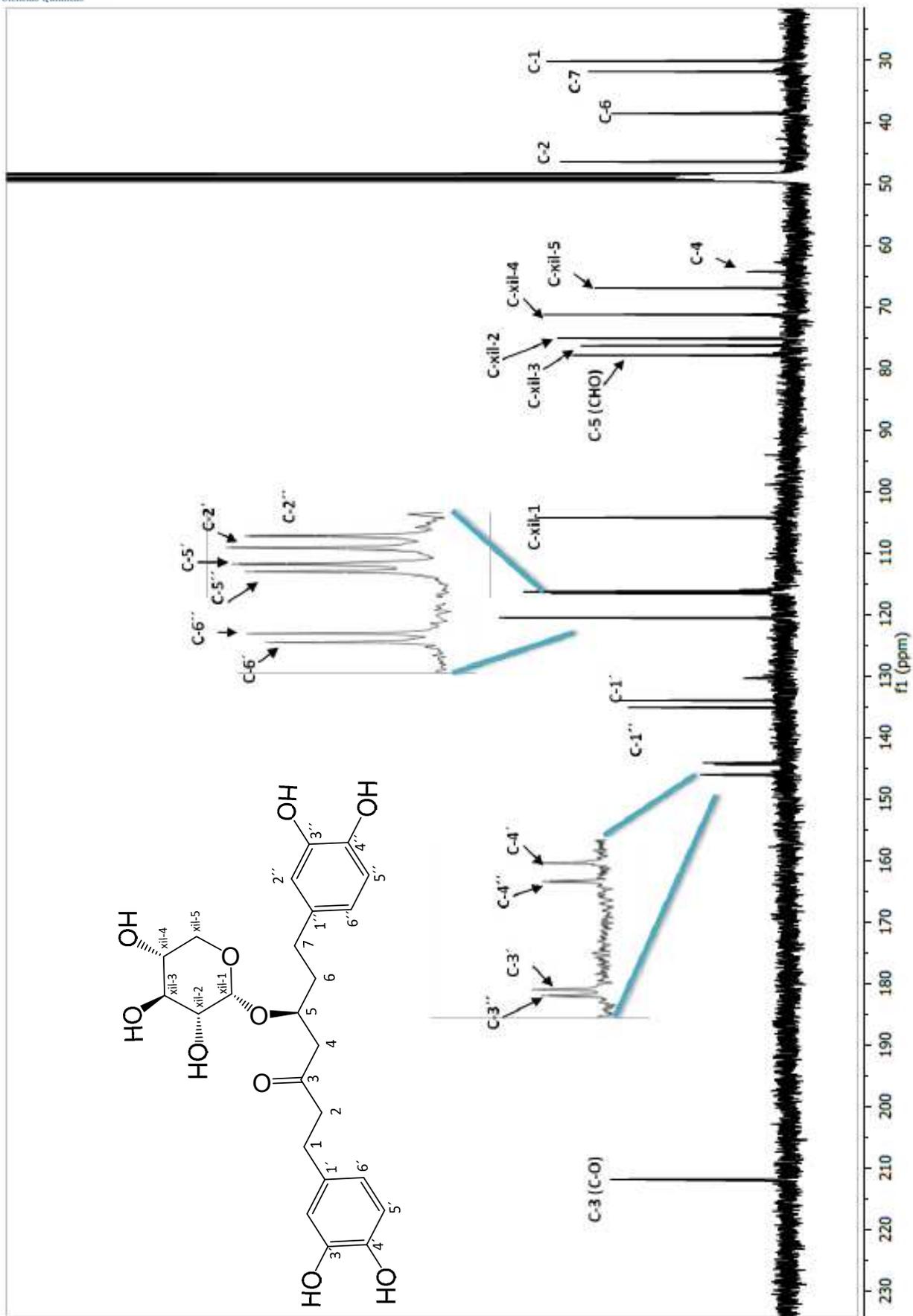
- Nagai, M., Kenmochi, N., Fujita, M., Furukawa, N., Inoue, T., Studies on the Constituents of Aceraceae Plants. Revised Stereochemistry of (-)-Centrololol, and New Glycosides from *Acer nikoense*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **34**:1056—1060 (1986).
- Nomura, M., Tokoroyama, T., Kubota, T., Biarylheptanoids and other constituents from wood of *Alnus japonica*, *Phytochemistry*, **20**:1097 (1981).
- Ohta, S., Aoki, T., Hirata, T., Suga, T., The structures of four diarylheptanoids glycosides from the female of *Alnus serrulatooides*, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, **1**:1635-42 (1984).
- Ohta S., Koyama M., Aoki T., Suga T., Absolute configuration of platyphylloside and (-)-centrololol, *Bulletin of Chemical Society of Japan*, **58**:2423—2424 (1985).
- Park, D., Kim, H.J., Jung, S.Y., Yook, C.-S., Jin, C., Lee, Y.S., A New Diarylheptanoid Glycoside from the Stem Bark of *Alnus hirsuta* and Protective Effects of Diarylheptanoid Derivatives in Human HepG2 Cells, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **58**(2):238—241 (2010).
- Pohjala, L., Alakurtti, S., Ahola T., Yli-Kauhaluoma, J., Tammela, P., Isolation of cytotoxic metabolites from targeted Peruvian Amazonian medicinal plants, *Journal of Natural Products*, **72**:1917-1926 (2009).
- Ragasa, C.Y., De Luna, R.D., Hofilena, J.G., Antimicrobial terpenoids from *Pterocarpus indicus*, *Natural Products Research*, **19**:305-309 (2005).
- Rao, T.S., Currie, J.L., Shaffer, A.F., Isakson, P.C., Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation*, **17**(6):723-741 (1993).
- Rastogi, S., Pandey, M.M., Rawat, A.K.S., Medicinal plants of the genus *Betula*—Traditional uses and a phytochemical–pharmacological review, *Journal of Ethnopharmacology*, **159**:62–83 (2015).
- Ryabinin, A.A., Matyukhina, L.H., Saltikova, I.A., Patil, F., Ourisson, G., Structure de l’alnincanona. Un triterpène demmaranique en C₃₁, *Bulletin of Society Chimical of France*, 1089 (1968).
- Sakkurai, N., Yaguci, Y., Inoue, T., Triterpenoids from *Myrica rubra*, *Phytochemistry*, **26**:217-219 (1987).
- Santamour, F.S., Vettel, H.E., The distribution of rhododendron in birch (*Betula*) species, *Biochemical Systematics and Ecology*, **6**:107-108 (1978).
- Santamour, F.S., Lundgren, L., Rhododendrin in *Betula*: a reappraisal, *Biochemical Systematics and Ecology*, **25**:335-341 (1997).
- Sati, S.C., Sati, N., Sati, O.P., Bioactive constituents and medicinal importance of genus *Alnus*, *Pharmacognosy Review*, **5**(10):174–183 (2011).
- Seibert, K., Masferrer, J.L., Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation, *Receptor*, **4**:17-23 (1994) (a).
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., Isakson, P., Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation, *Proceedings of the National Academy of Science of U.S.A.*, **91**:12013 (1994) (b).
- Smith E., Lundgren L.N., Andersson R., Arylbutanoid and diarylheptanoid glycosides from inner bark of *Betula Pendula*, *Phytochemistry*, **32**:365-369 (1993).
- Smith, W.L., Marnett, L.J., DeWitt, D.L., Prostaglandin and thromboxane biosynthesis, *Pharmacology & Therapeutics*, **49**:153–179 (1991).
- Spencer, A.G., Woods, J.W., Arakawa, T., Singer, I.I., Smith, W.L., Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy, *Journal of Biological Chemistry*, **273**:9886–9893 (1998).

- Subbaramaiah, K., Telang, N., Ramonetti, J.T., Araki, R., DeVito, B., Weksler, B.B., Dannenberg, A.J., Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells, *Cancer Research*, **56**:4424-4429 (1996).
- Sunnerheim-Sjoberg, K.; Palo, R. T.; Theander, O.; Knutsson, P. G., Chemical defense in birch. Platyphylloside: A phenol from *Betula pendula* inhibiting digestibility. *Journal of Chemistry Ecology*, **14**:549-560 (1988).
- Suga, T., Iwata, N., Asakawa, Y., Chemical Constituents of the Male Flower of *Alnus pendula* (Betulaceae), *Bulletin of Chemical Society of Japan*, **45**:2058 (1972).
- Suga, T., Ohta, S., Hirata, T., The absolute configuration of diarylheptanoid xyloside, oregonin, isolated from the female flowers of *Alnus serrulatoides*. *Chemical Letters*, **11**:895–898 (1982).
- Sunnerheim, K., Palo, R.T., Theander, O., Knutsson, P.G., Chemical defense in birch. Platyphylloside: A Phenol from *Betula pendula* Inhibiting Digestibility, *Journal of Chemical Ecology*, **14**:549 (1988).
- Terazawa, M., Koga, T., Okuyama, H., & Miyake, M., Identification of the constituents of low molecular weight fraction obtained from the birch wood degraded by *Phanerochaete chrysosporium*, *Mokuzai Gakkaishi*, **19**:47 (1973).
- Uddin, A.V., Ur-Rahman, A., *Handbook of Natural Products*, Amsterdam: Elsevier, **2**:533-534 (1994).
- Valente, C., Pedro, M., Duarte, A., Nascimento, M.S., Abreu, P.M., Ferreira, M.J., Bioactive diterpenoids, a new jatrophane and two ent-abietanes, and others constituents from *Euphorbia pubescens*, *Journal of Natural Products*, **67**:902-904 (2004).
- Vane, J.R., Indomethacin and Aspirin abolish Prostaglandin Release from the Spleen, *Nature (London) New Biology*, **231**:232-235 (1971).
- WenYi, J., Xing, F.C., MinKyun, N., Jung, J.L., KiHwan, B., Triterpenoids and Diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* Inhibit HIF-1 in AGS Cells, *Archives of Pharmaceutical Research*, **30**(4):412-418 (2007).
- Winuthayanon, W., Piyachaturawat, P., Suksamrarn, A., Ponglikitmongkol, M., Arao, Y., Diarylheptanoid Phytoestrogens Isolated from the Medicinal Plant *Curcuma comosa*: Biologic Actions *in Vitro* and *in Vivo* Indicate Estrogen Receptor-Dependent Mechanisms, *Environmental Health Perspectives*, **117**(7): 1155-61 (2009).
- World Health Organization, *Medicina Tradicional*, World Health Organization, Geneva, Swiss (2013).
- Yadav, D., Antifilarial diarylheptanoids from *Alnus nepalensis* leaves growing in high altitude areas of Uttarakhand, India, *Phytomedicine*, **20**:124-132 (2013).
- Yi-Chun, L., Chien-Kuang, C., Wan-Wan, L., Shoei-Sheng, L., A comprehensive investigation of anti-inflammatory diarylheptanoids from the leaves of *Alnus formosana*, *Phytochemistry*, **73**:84-94 (2012).
- Zou, J.H., Dai, J., Chen X., Yuan, J.Q., Pentacyclic triterpenoids from leaves of *Excoecaria agallocha*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **54**:920-921 (2006).

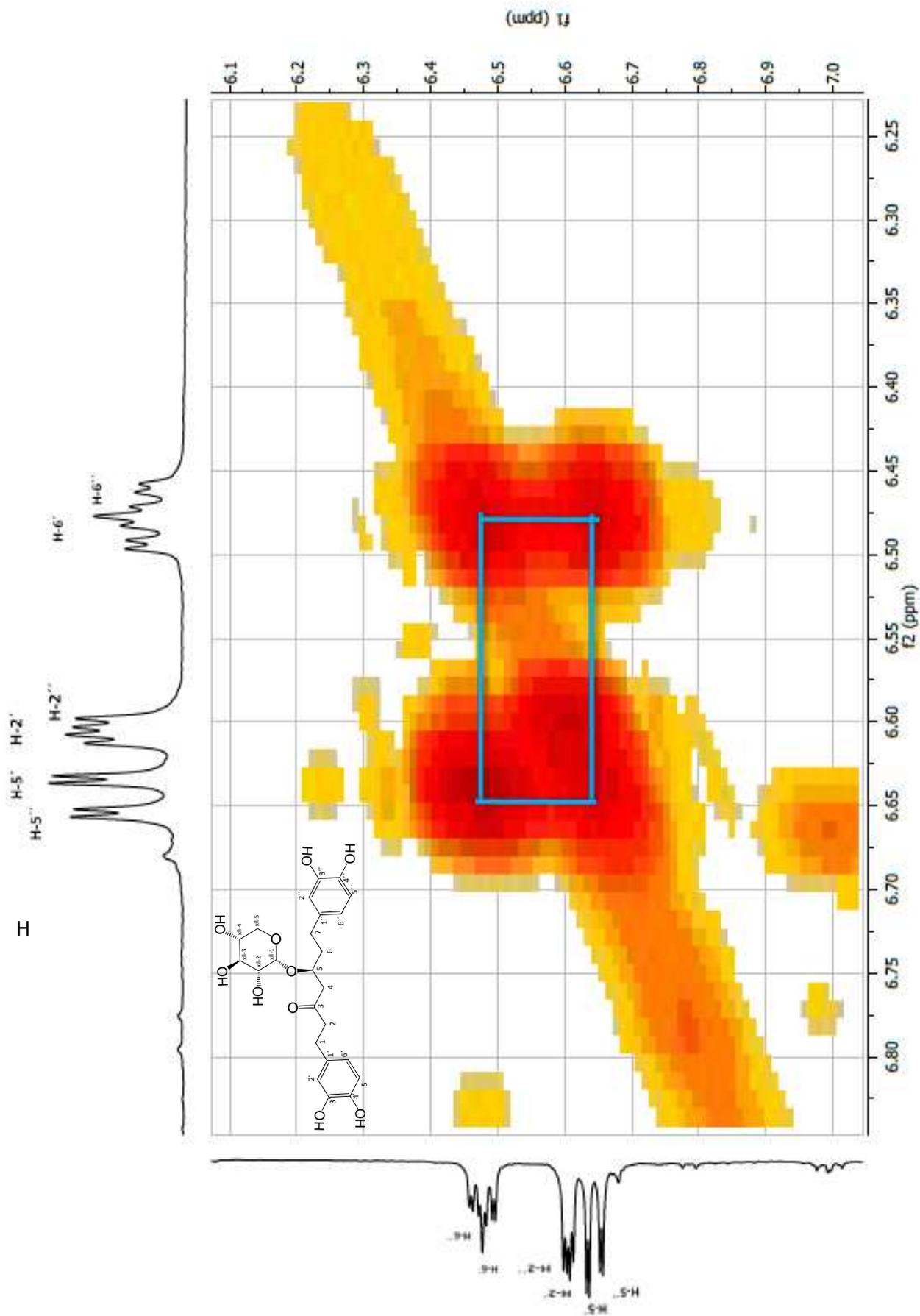
13. ANEXO I. Espectros



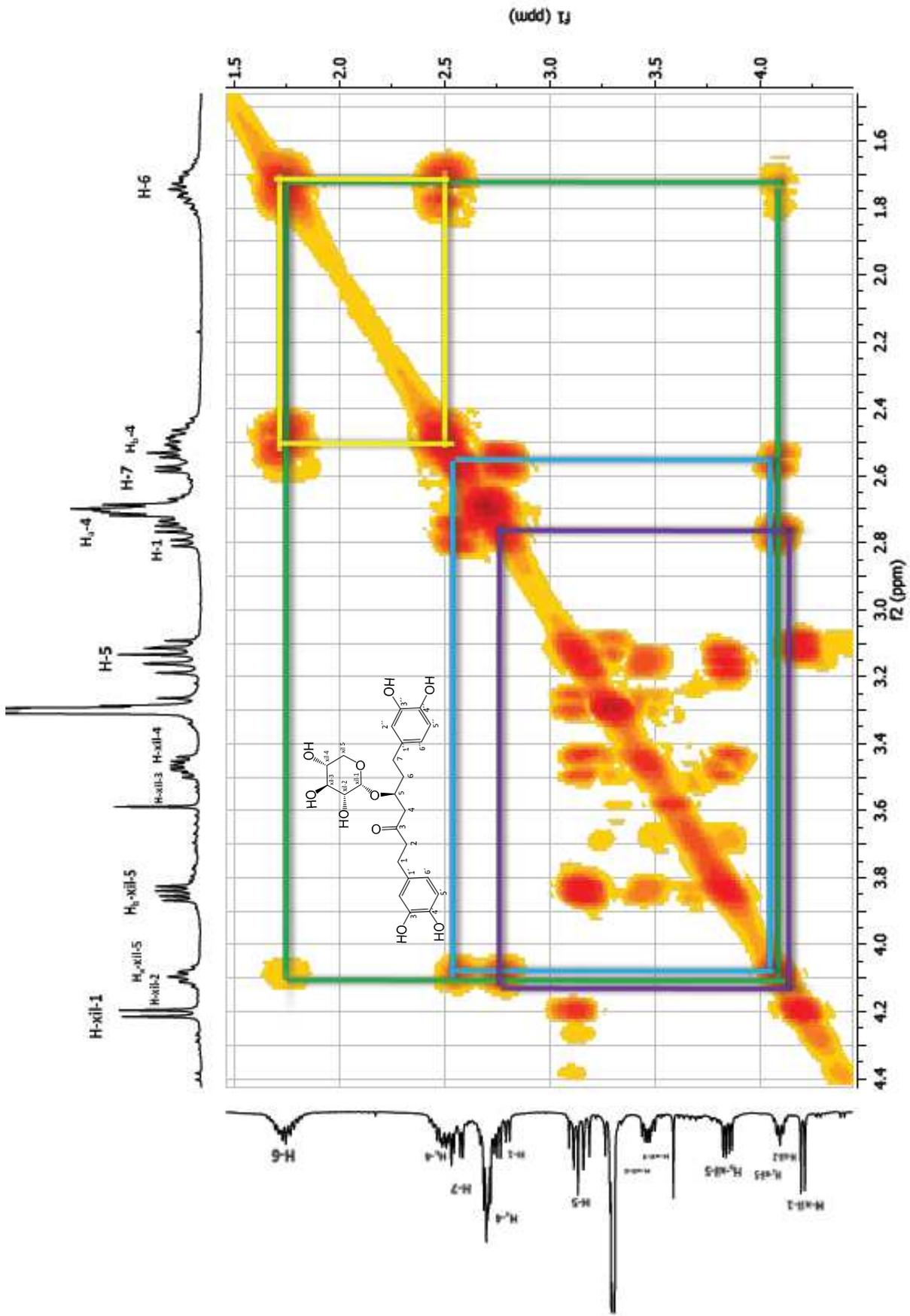
Espectro 1. ¹H-RMN de oregonina, CD₃OD, 400 MHz.



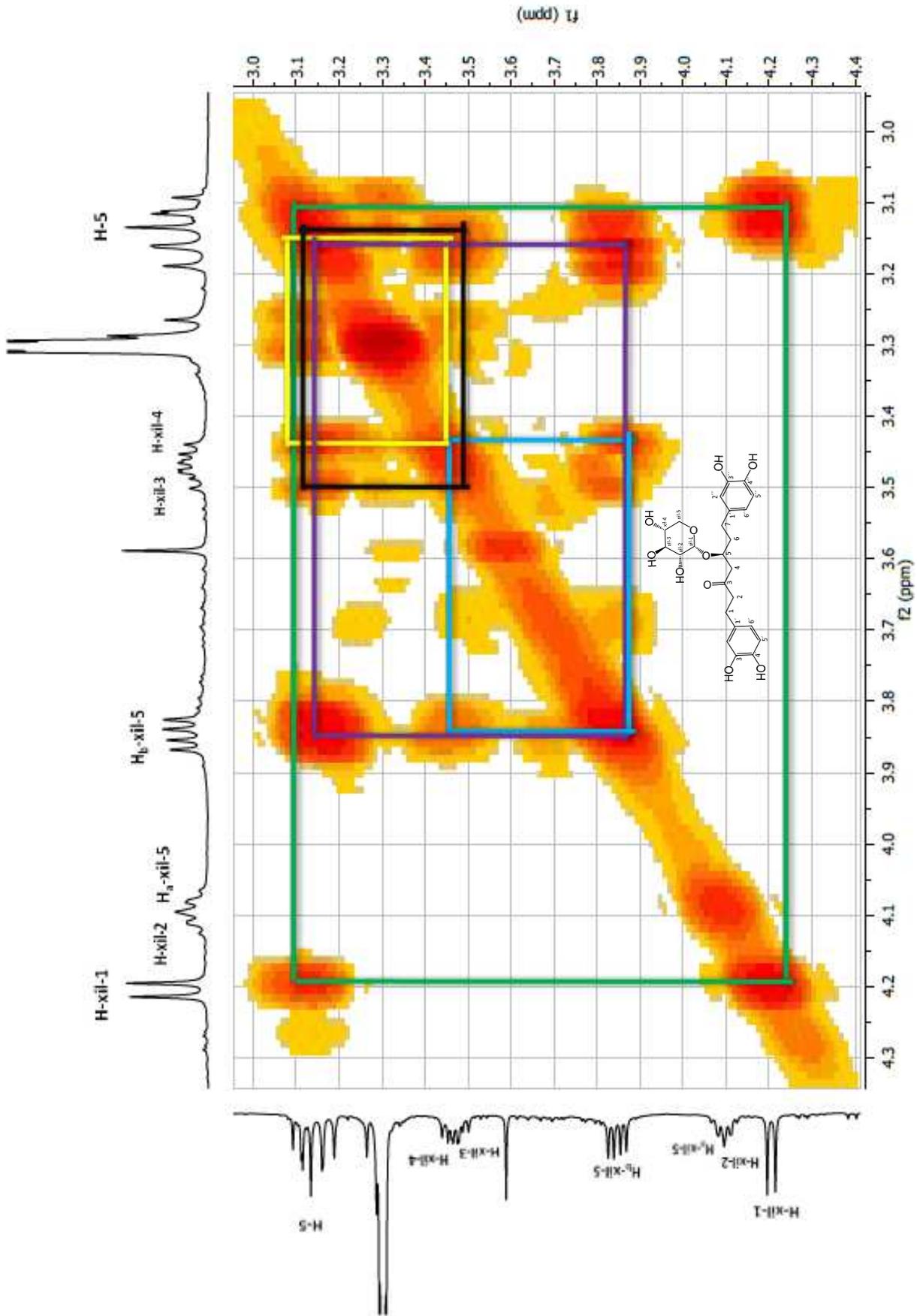
Espectro 2. ^{13}C -RMN de oregonina, CD_3OD , 100 MHz.



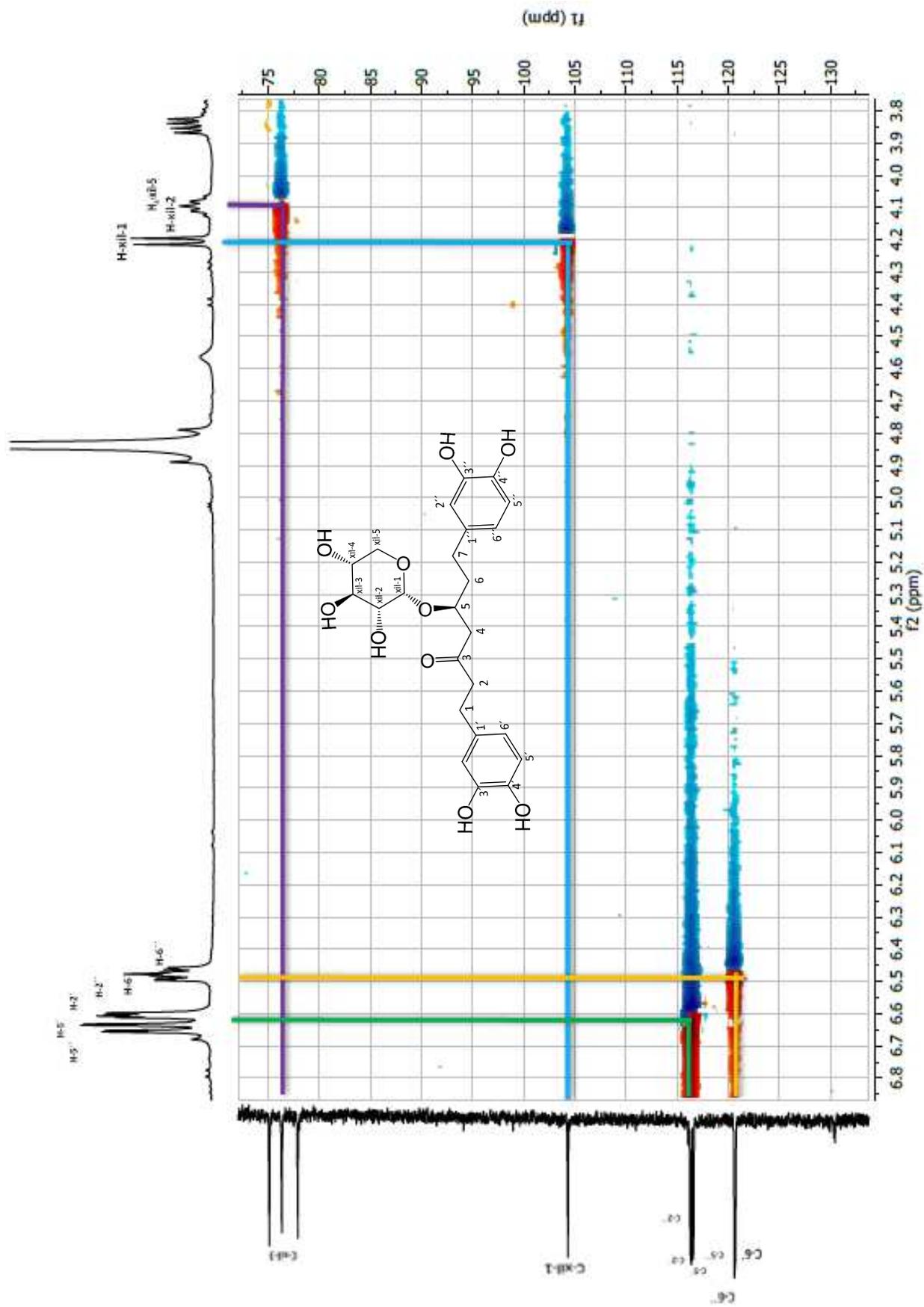
Espectro 3. ^1H - ^1H COSY de oregonina (ampliación 1).



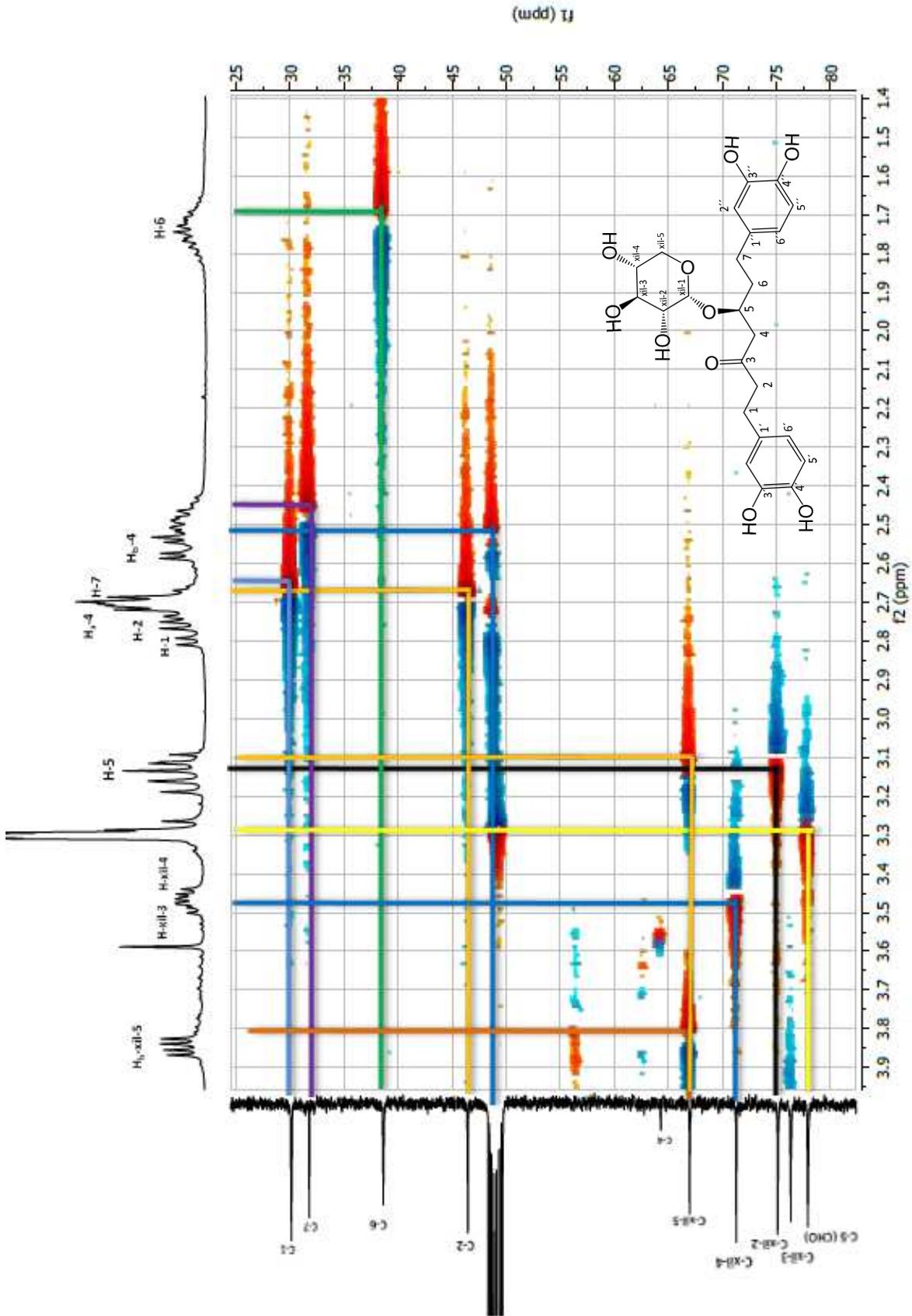
Espectro 4. ^1H - ^1H COSY de oregonina (ampliación 2).



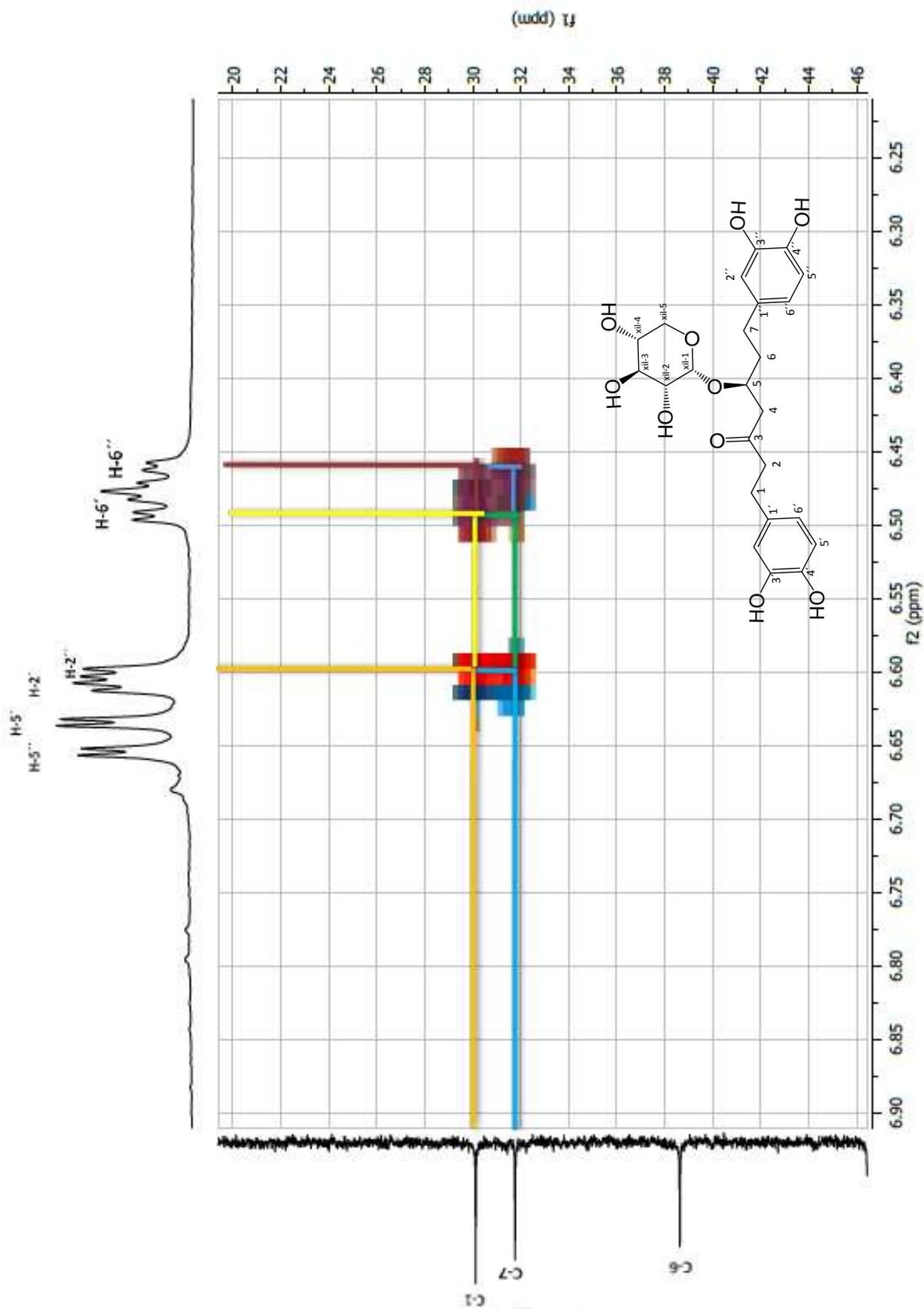
Espectro 5. ¹H-¹H COSY de oregonina (ampliación 3).



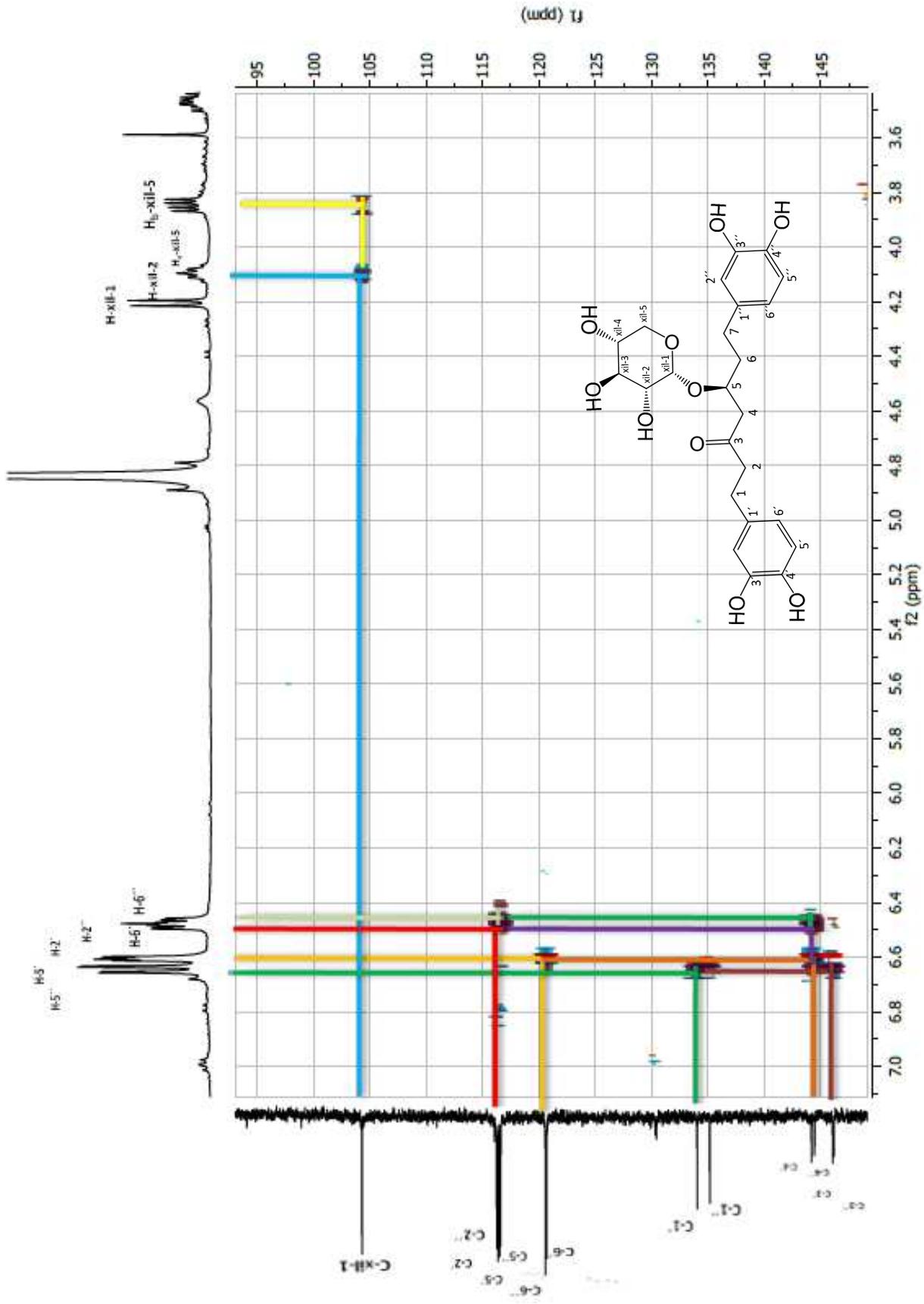
Espectro 6. ^1H - ^{13}C HSQC de oregonina (ampliación 1).



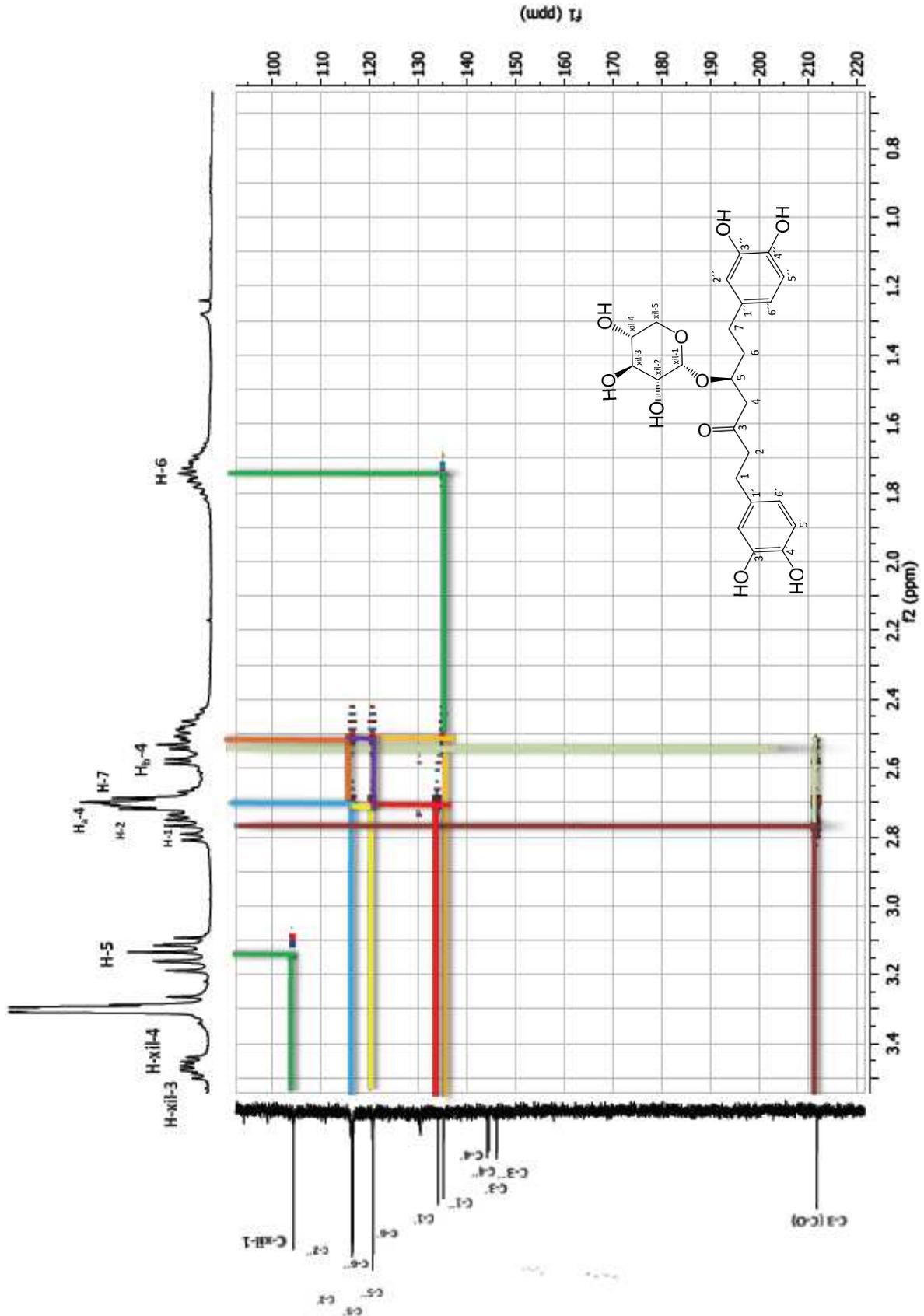
Espectro 7. ^1H - ^{13}C HSQC de oregonina (ampliación 2).



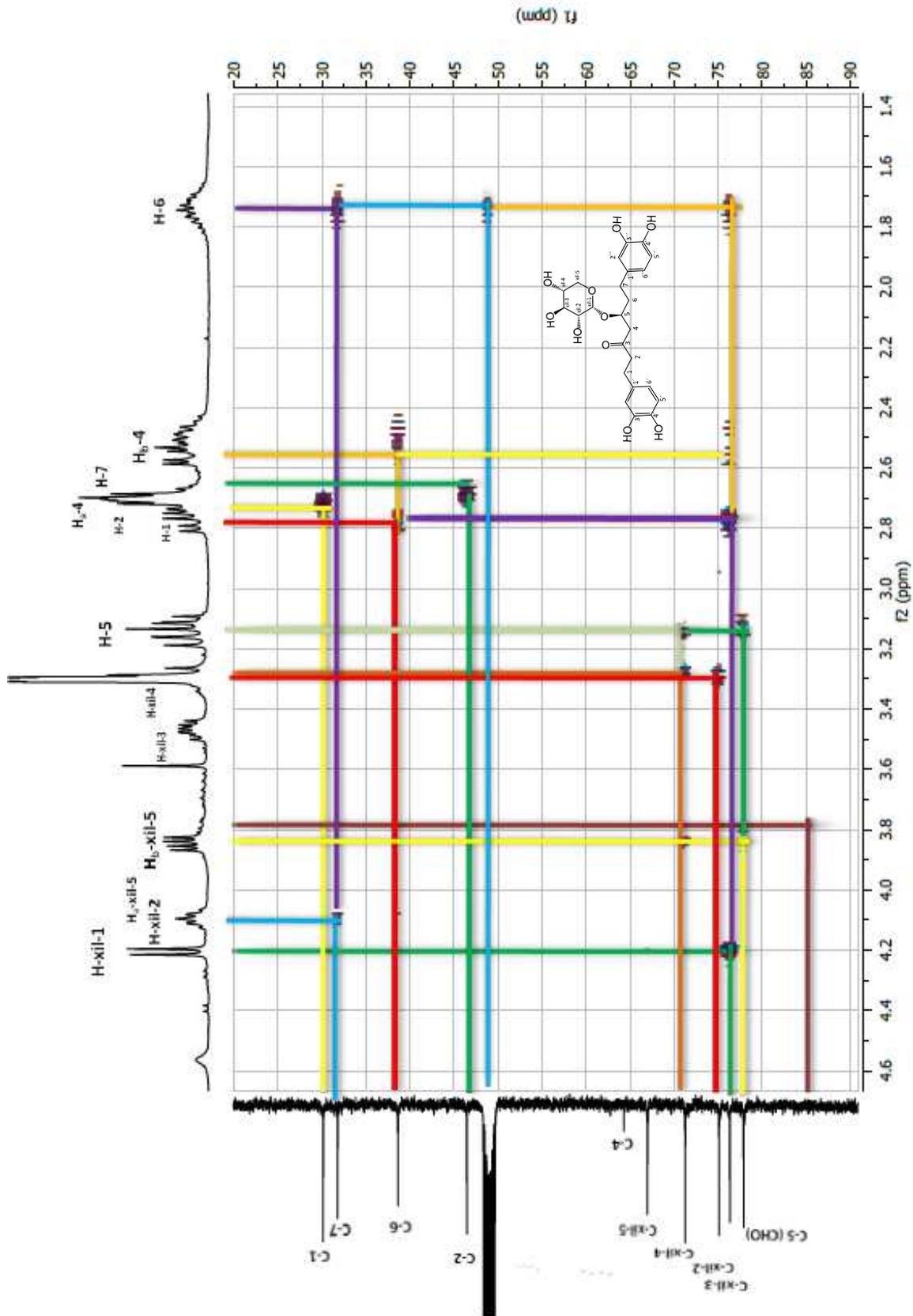
Espectro 8. ^1H - ^{13}C HMBC de oregonina (ampliación 1).



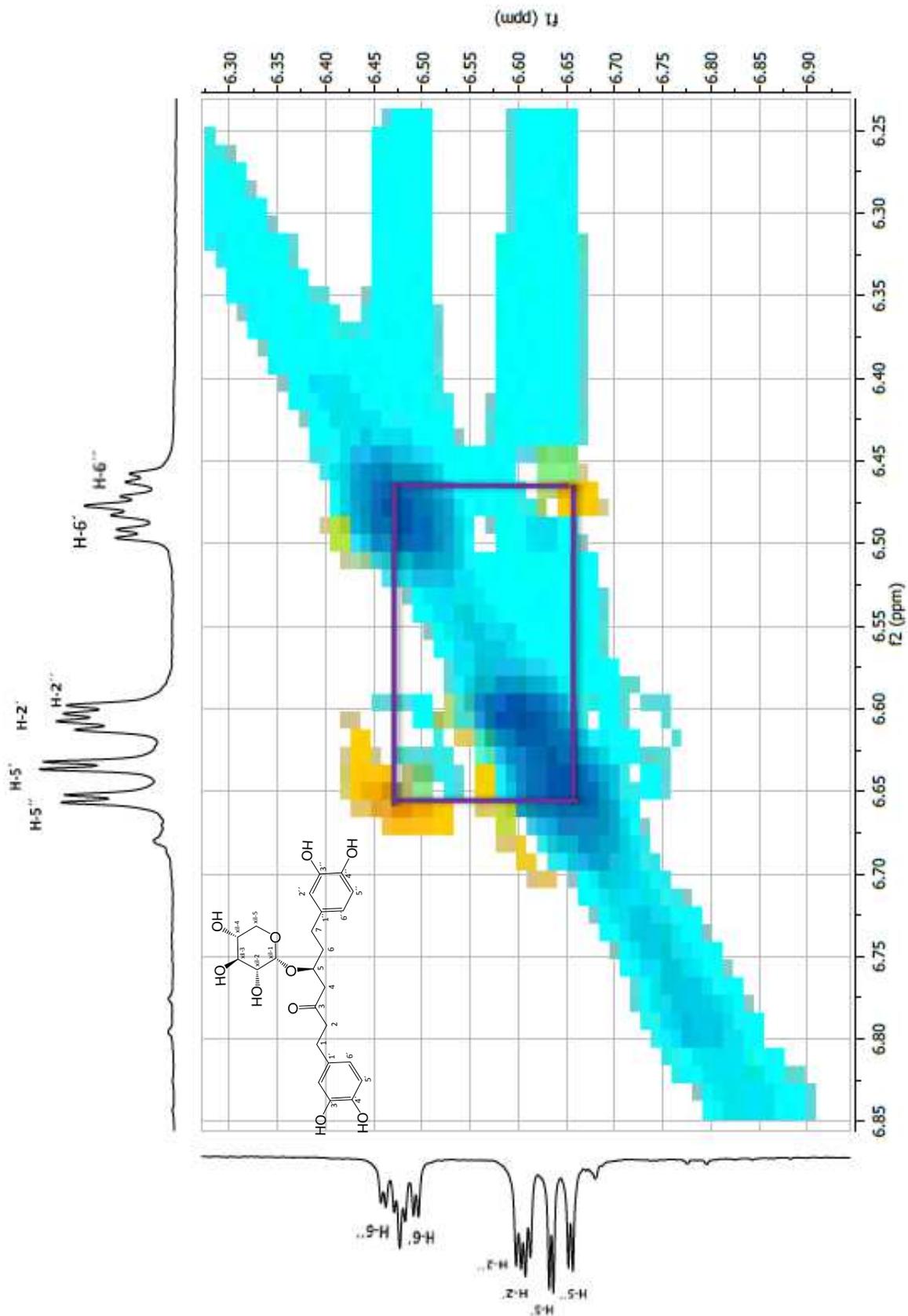
Espectro 9. ^1H - ^{13}C HMBC de oregonina (ampliación 2).



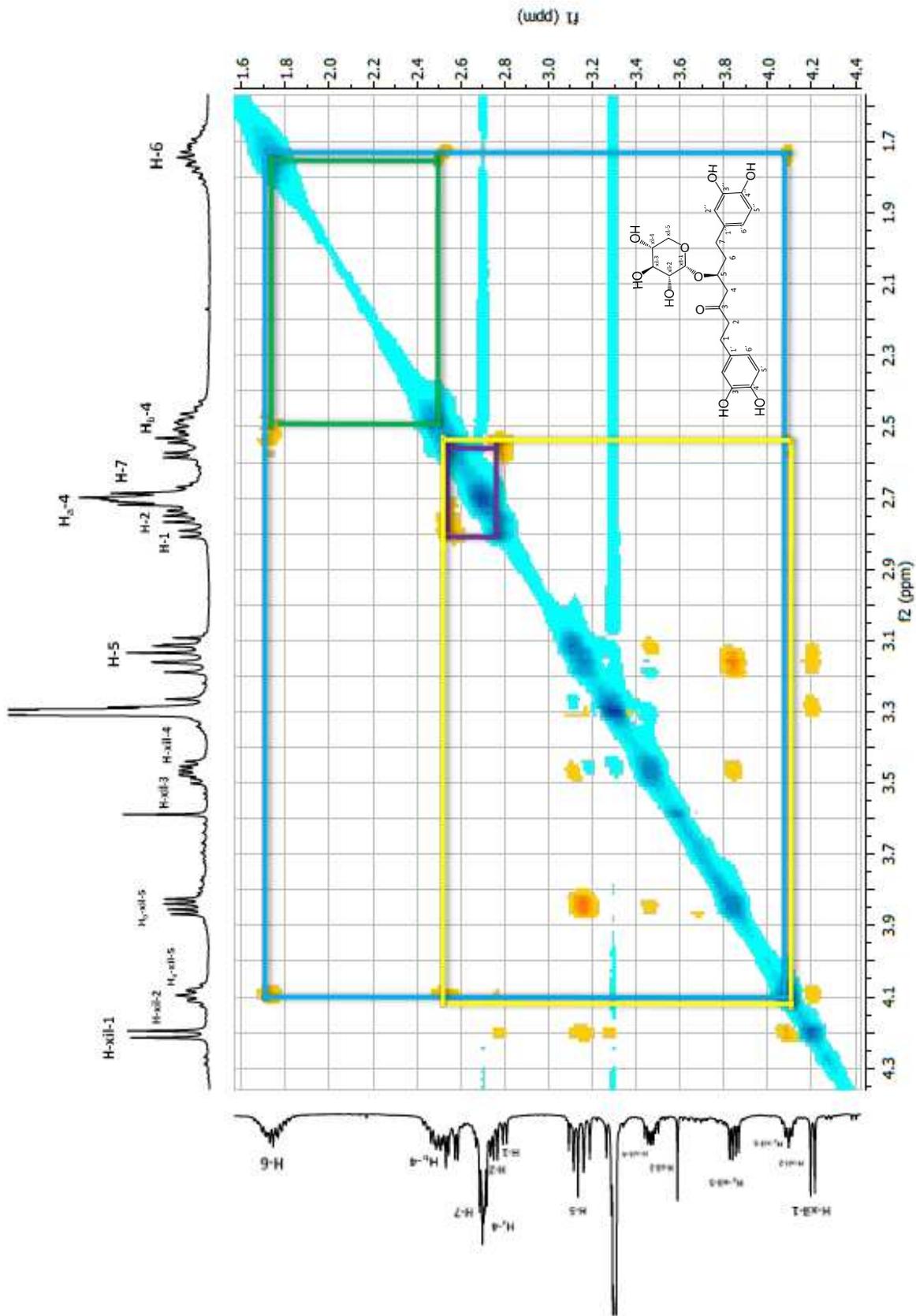
Espectro 10. ^1H - ^{13}C HMBC de oregonina (ampliación 3).



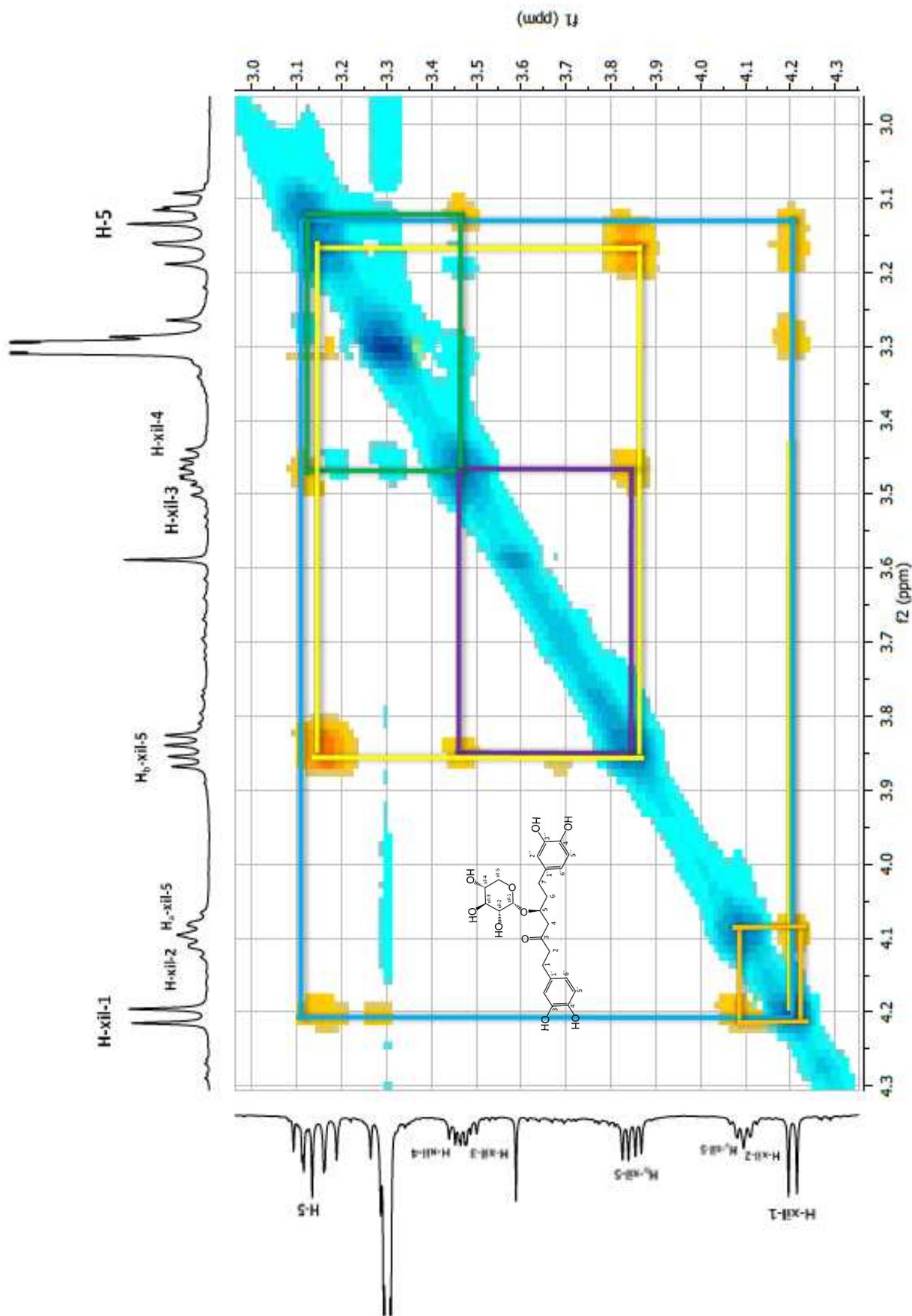
Espectro 11. ^1H - ^{13}C HMBC de oregonina (ampliación 4).



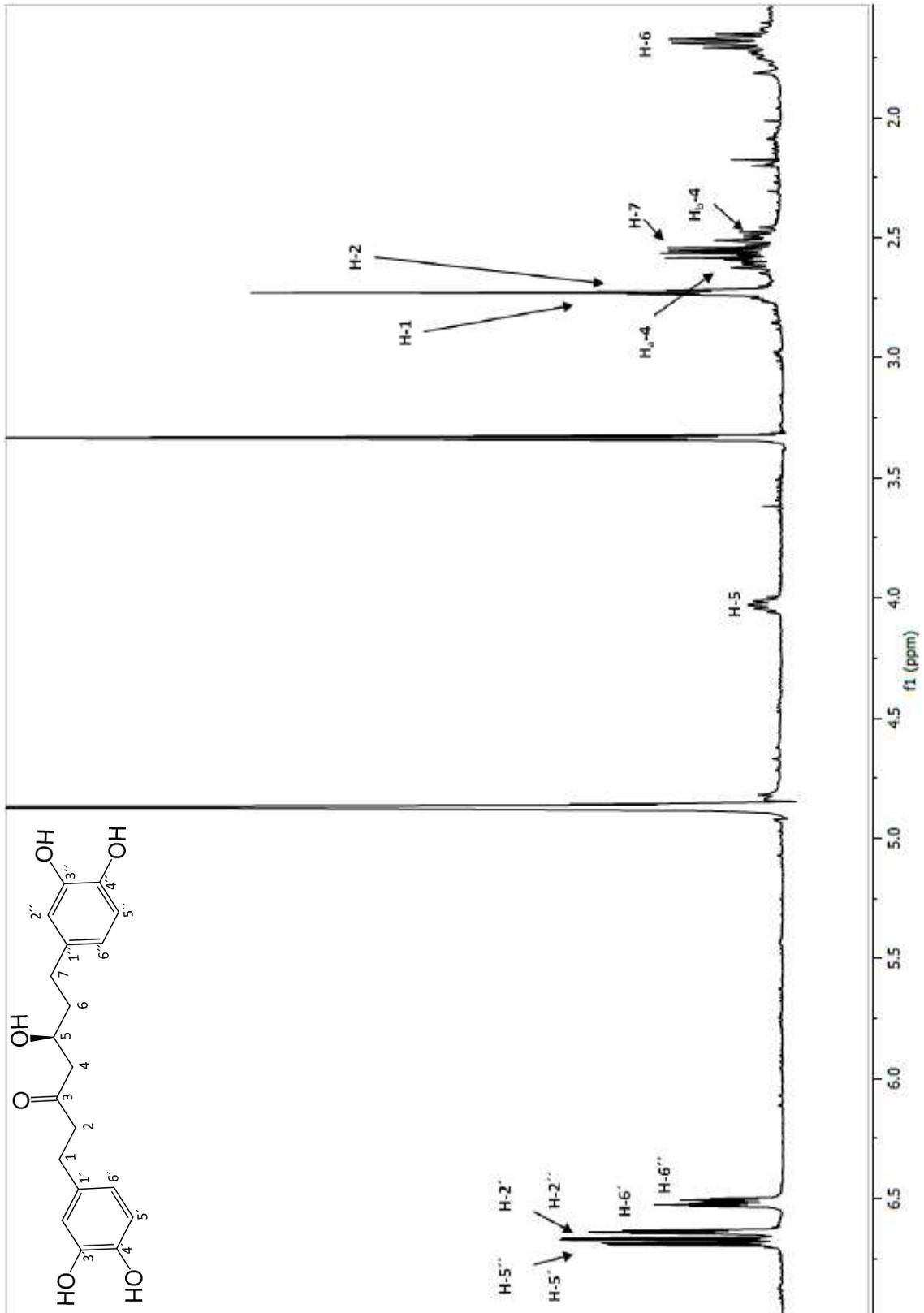
Espectro 12. ^1H - ^1H NOESY de oregonina (ampliación 1).



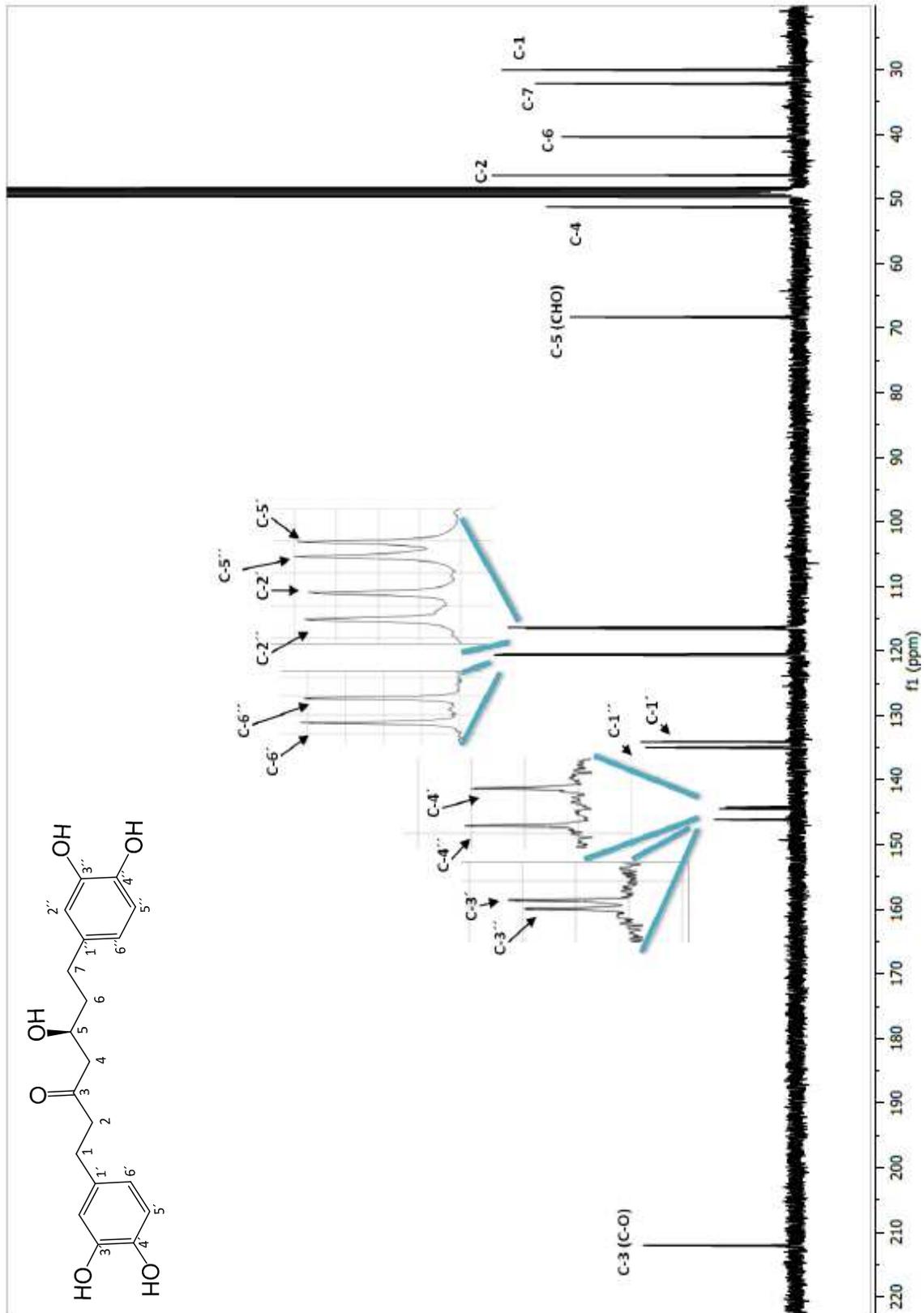
Espectro 13. ^1H - ^1H NOESY de oregonina (ampliación 2).



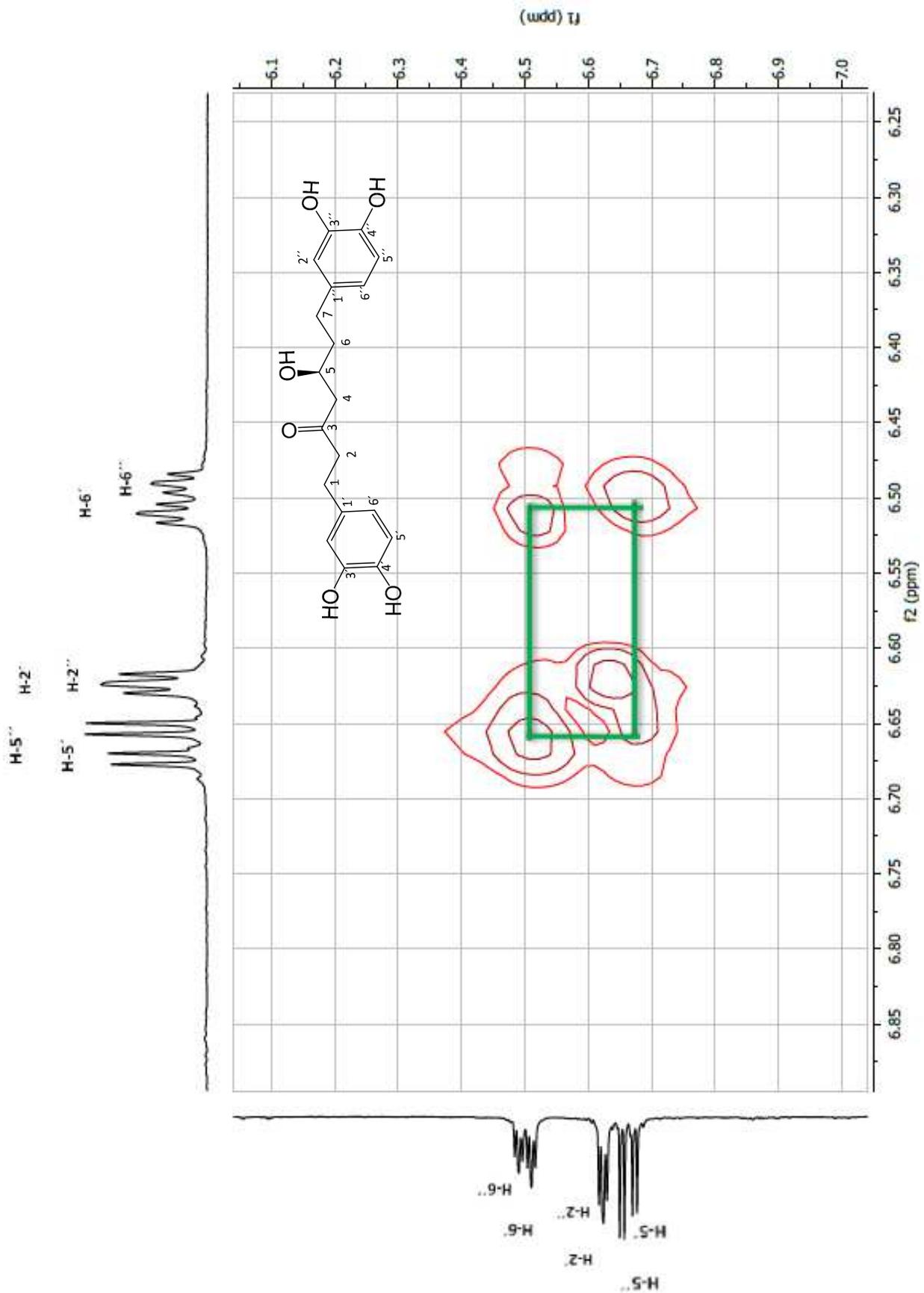
Espectro 14. ¹H-¹H NOESY de oregonina (ampliación 3).



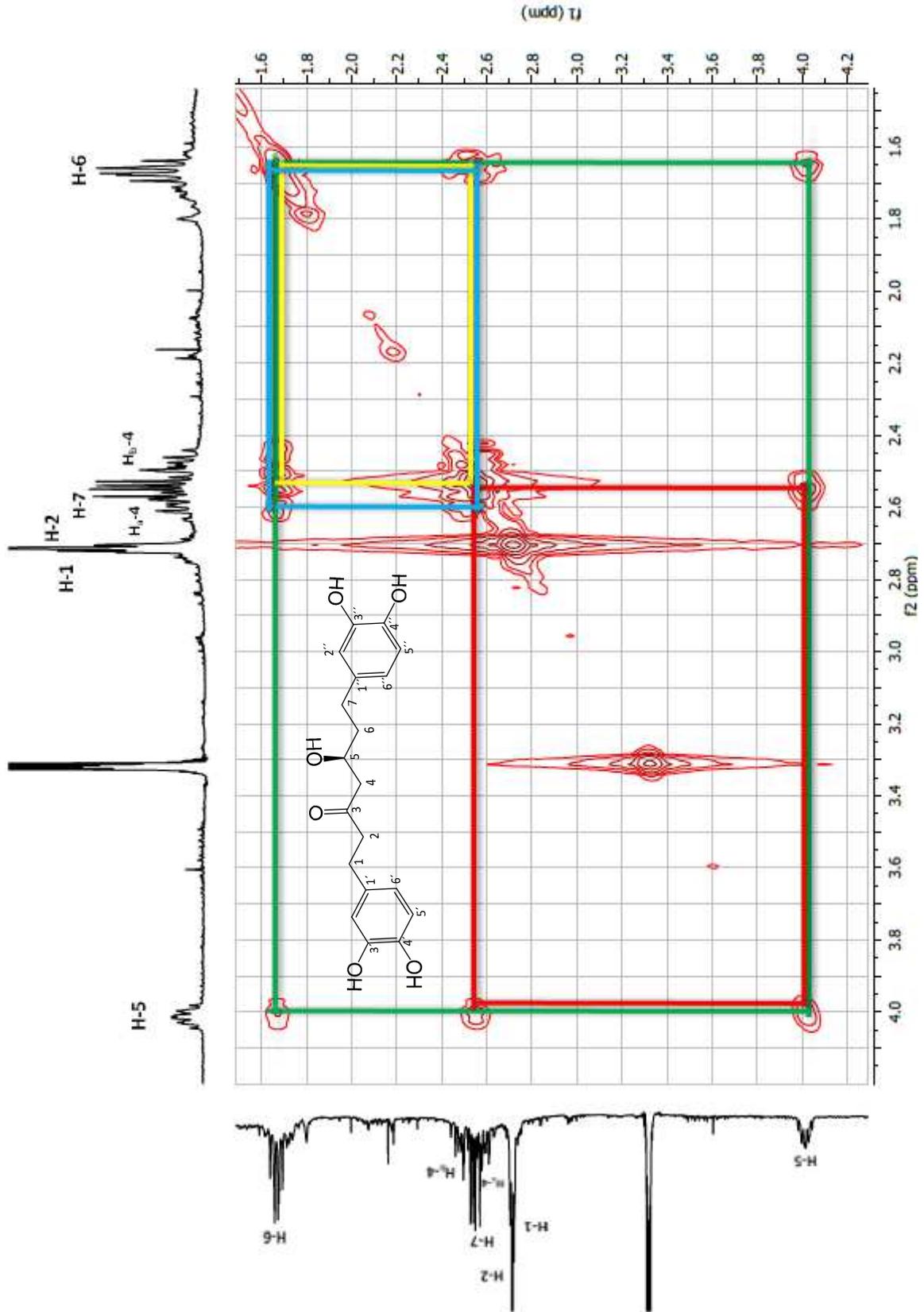
Espectro 15. ^1H -RMN de hirsutanonol, CD_3OD , 400 MHz.



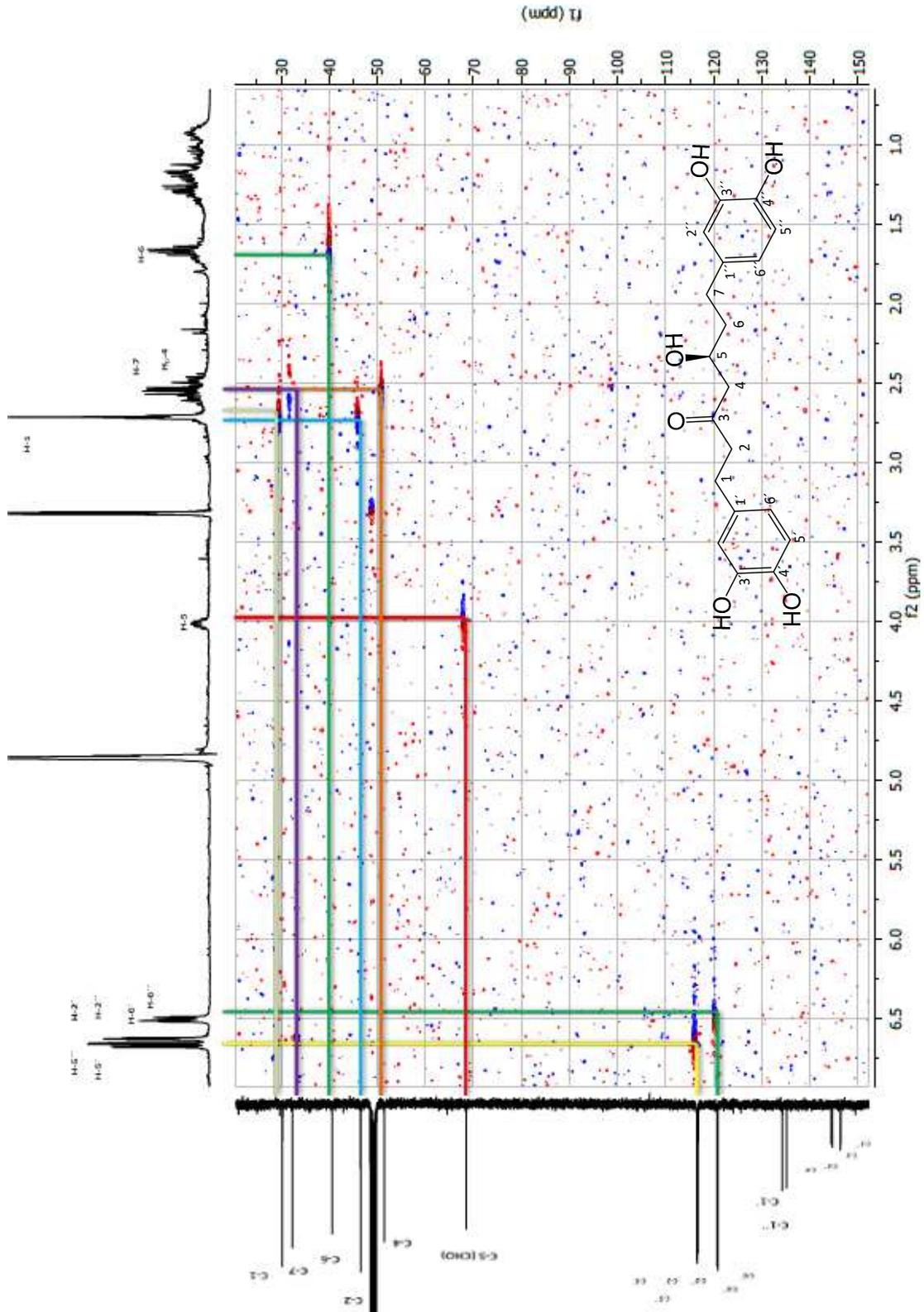
Espectro 16. ^{13}C -RMN de hirsutanonol, CD_3OD , 100 MHz.



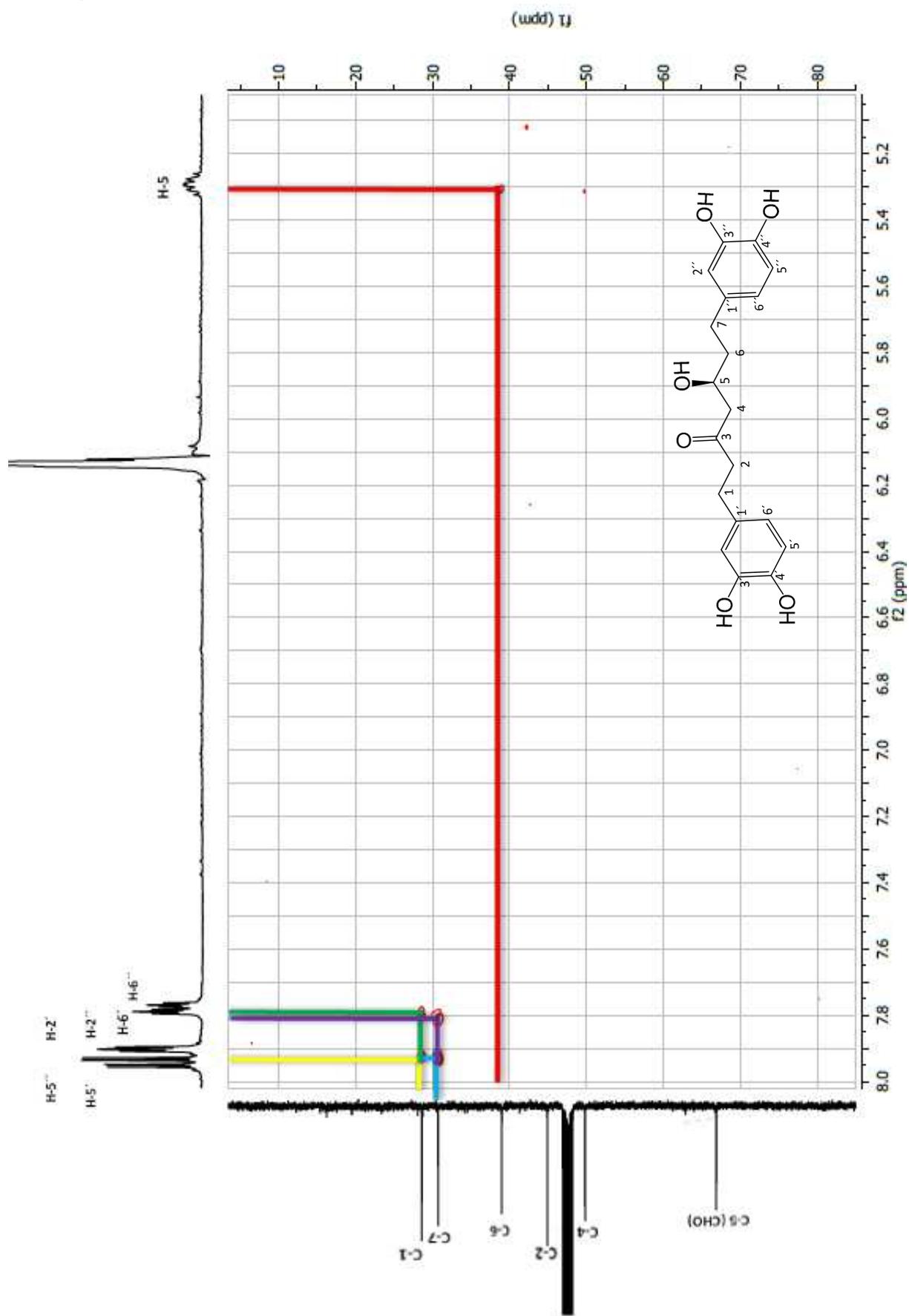
Espectro 17. ^1H - ^1H COSY de hirsutanonol (ampliación 1).



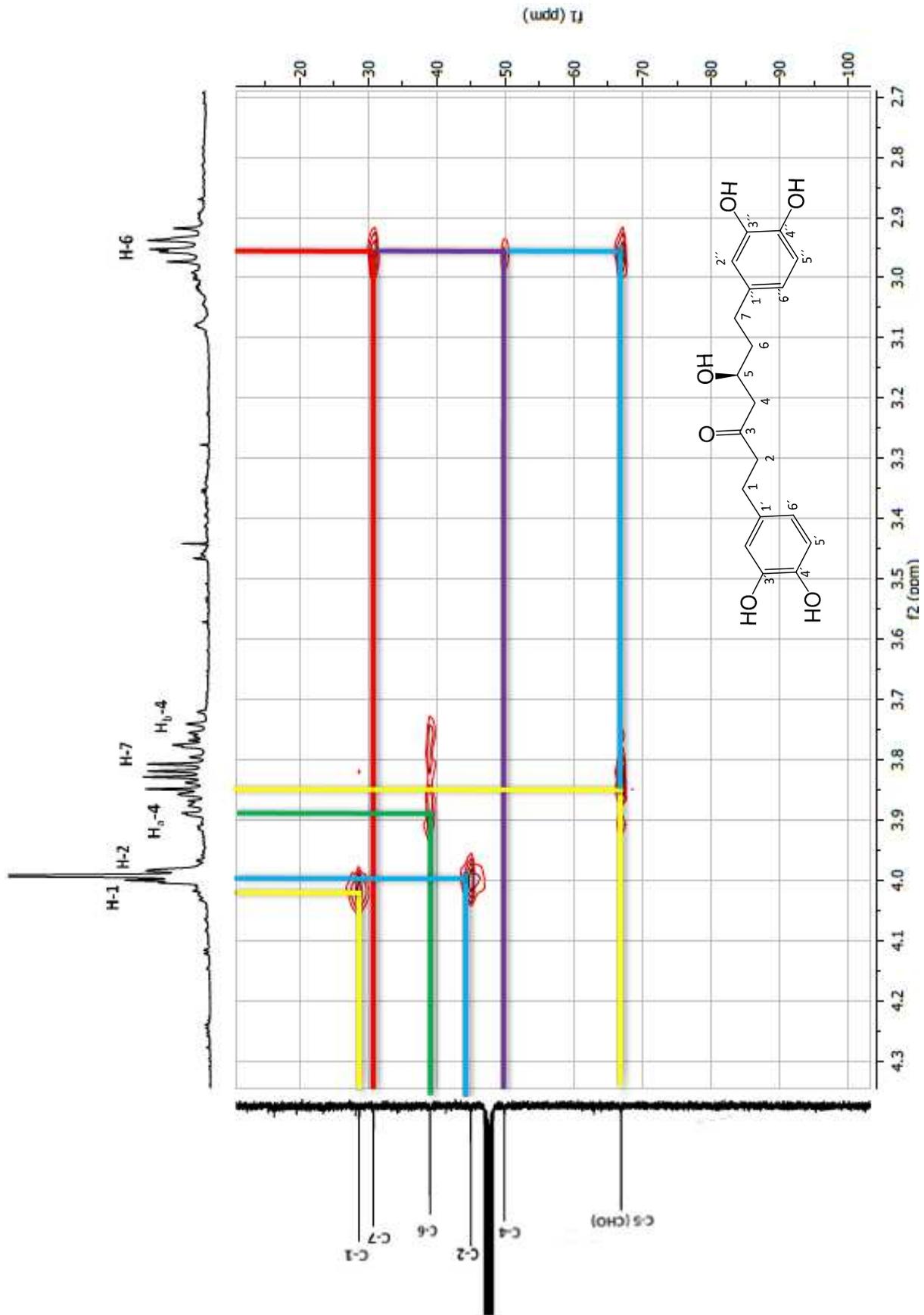
Espectro 18. ^1H - ^1H COSY de hirsutanonol (ampliación 2).



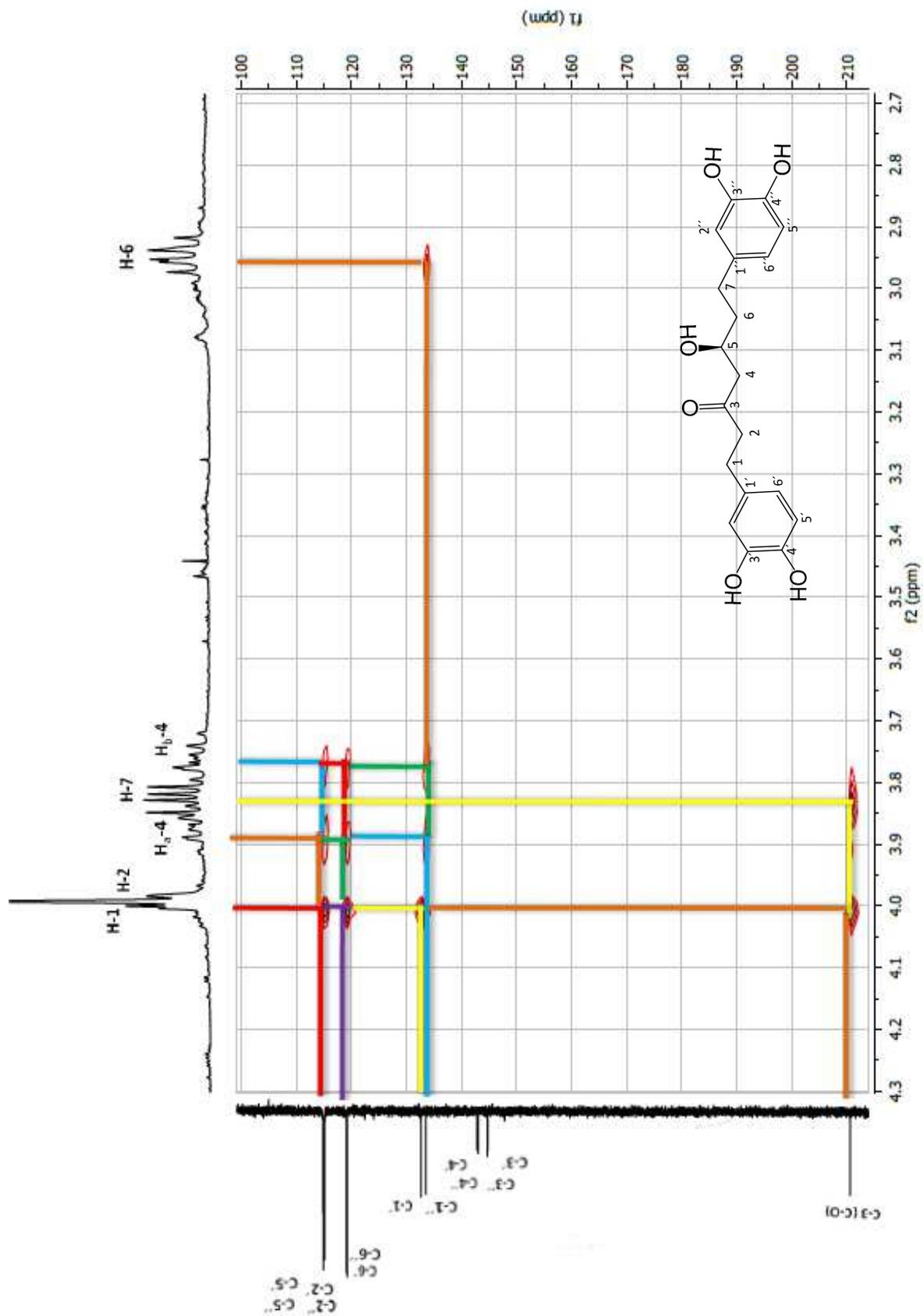
Espectro 19. ^1H - ^{13}C HSQC de hirsutanonol.



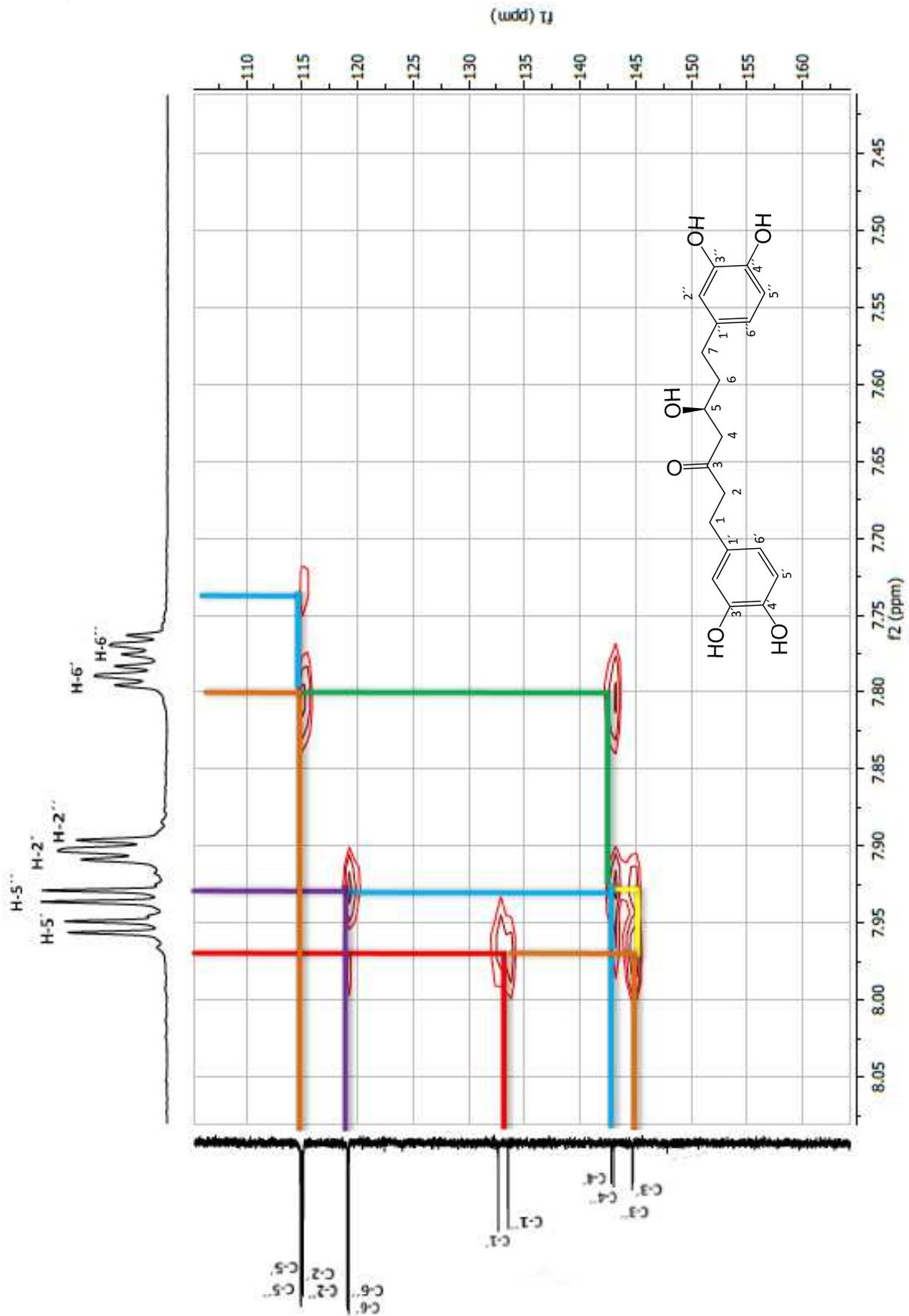
Espectro 20. ^1H - ^{13}C HMBC de hirsutanonol (ampliación 1).



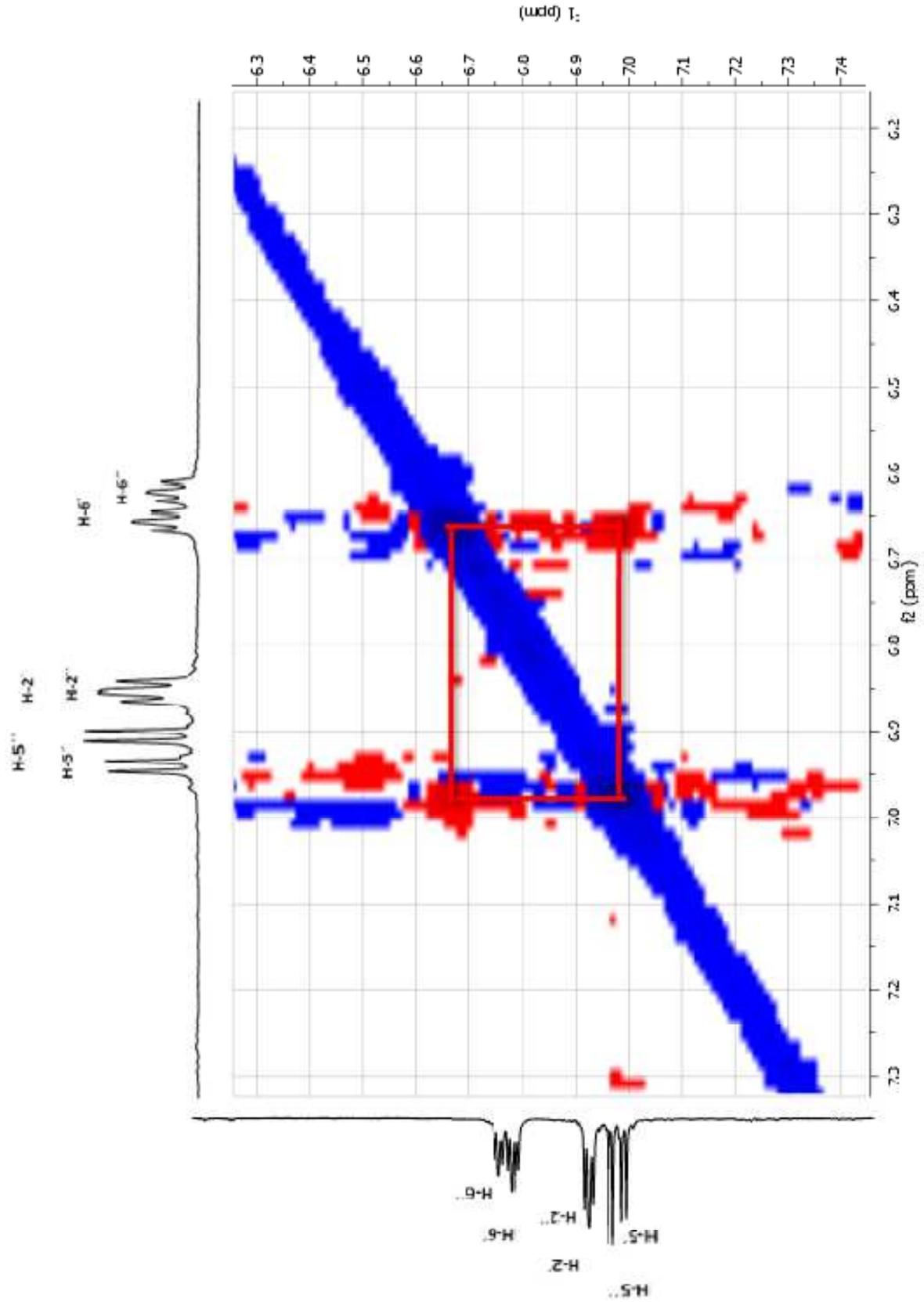
Espectro 21. ^1H - ^{13}C HMBC de hirsutanonol (ampliación 2).



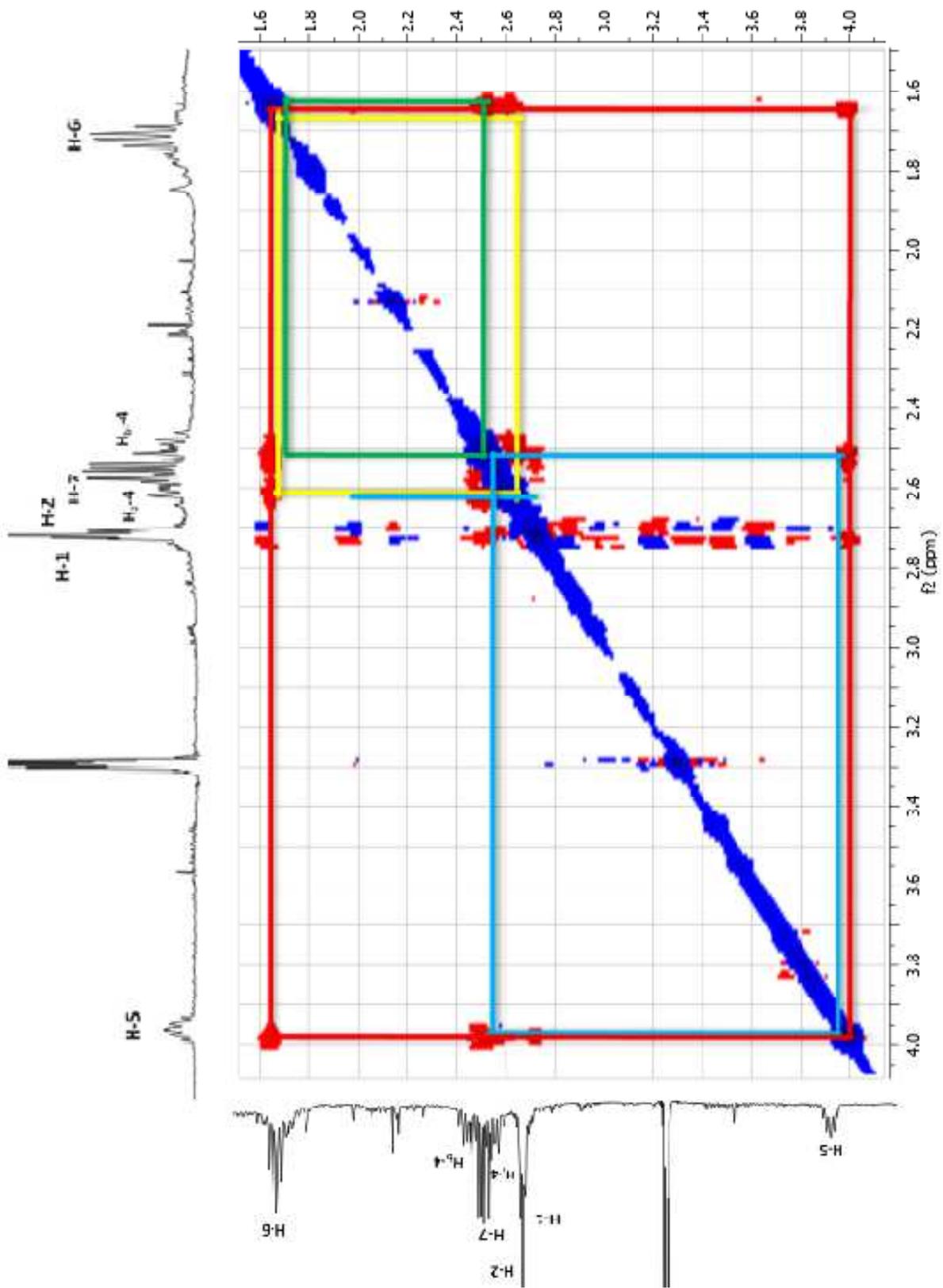
Espectro 22. ^1H - ^{13}C HMBC de hirsutanonol (ampliación 3).



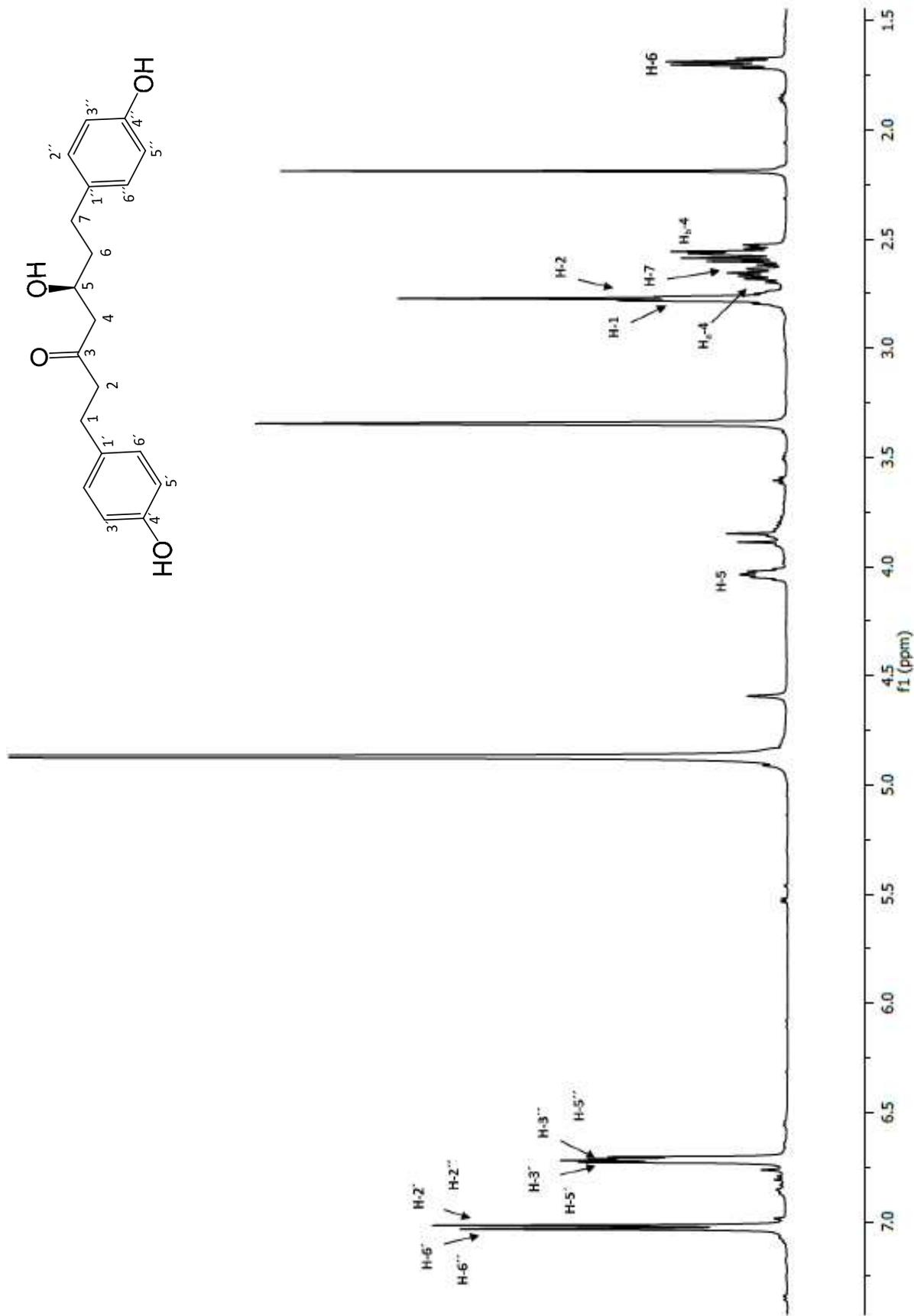
Espectro 23. ^1H - ^{13}C HMBN de hirsutanonol (ampliación 4).



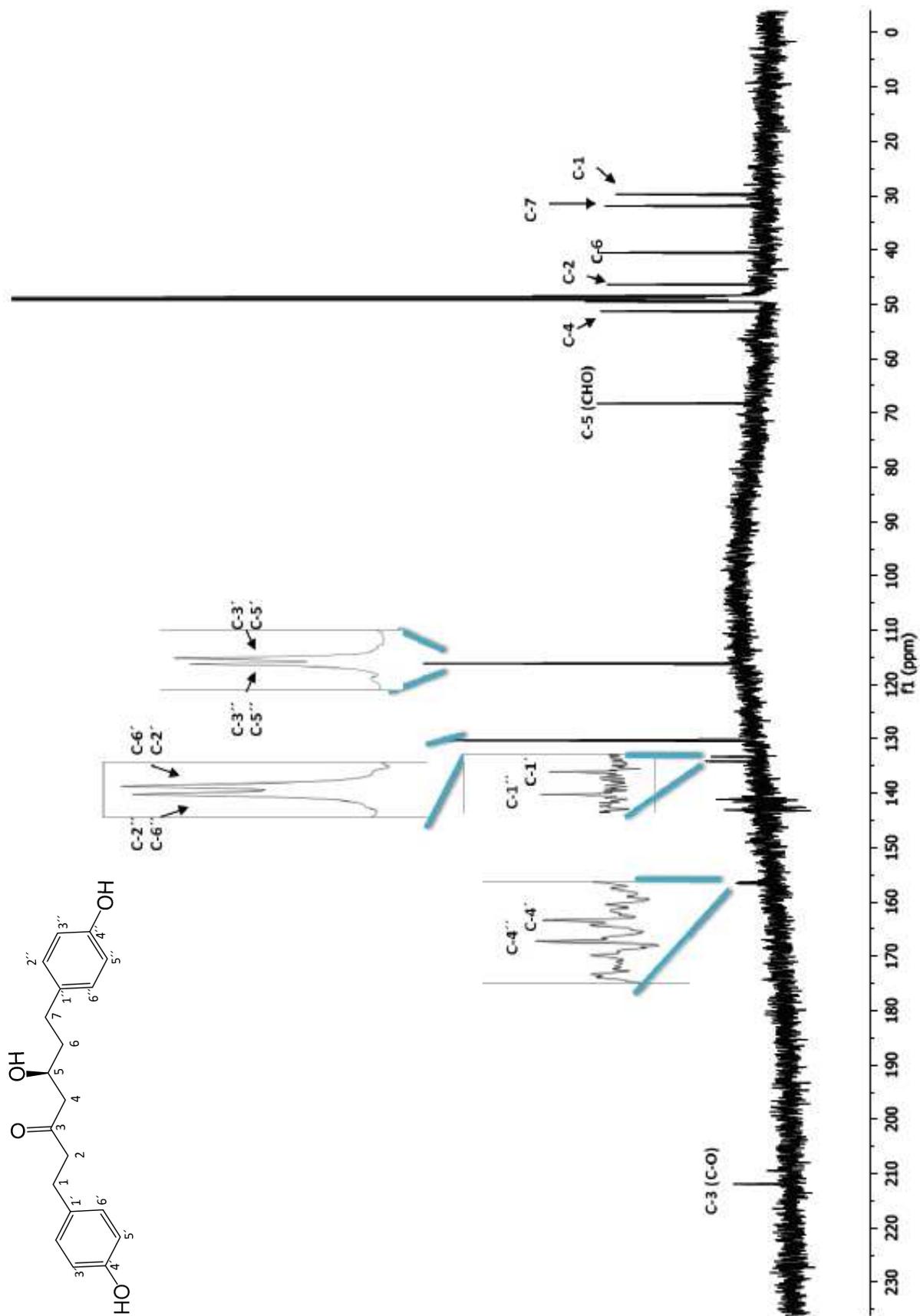
Espectro 24. ^1H - ^1H NOESY de hirsutanonol (ampliación 1).



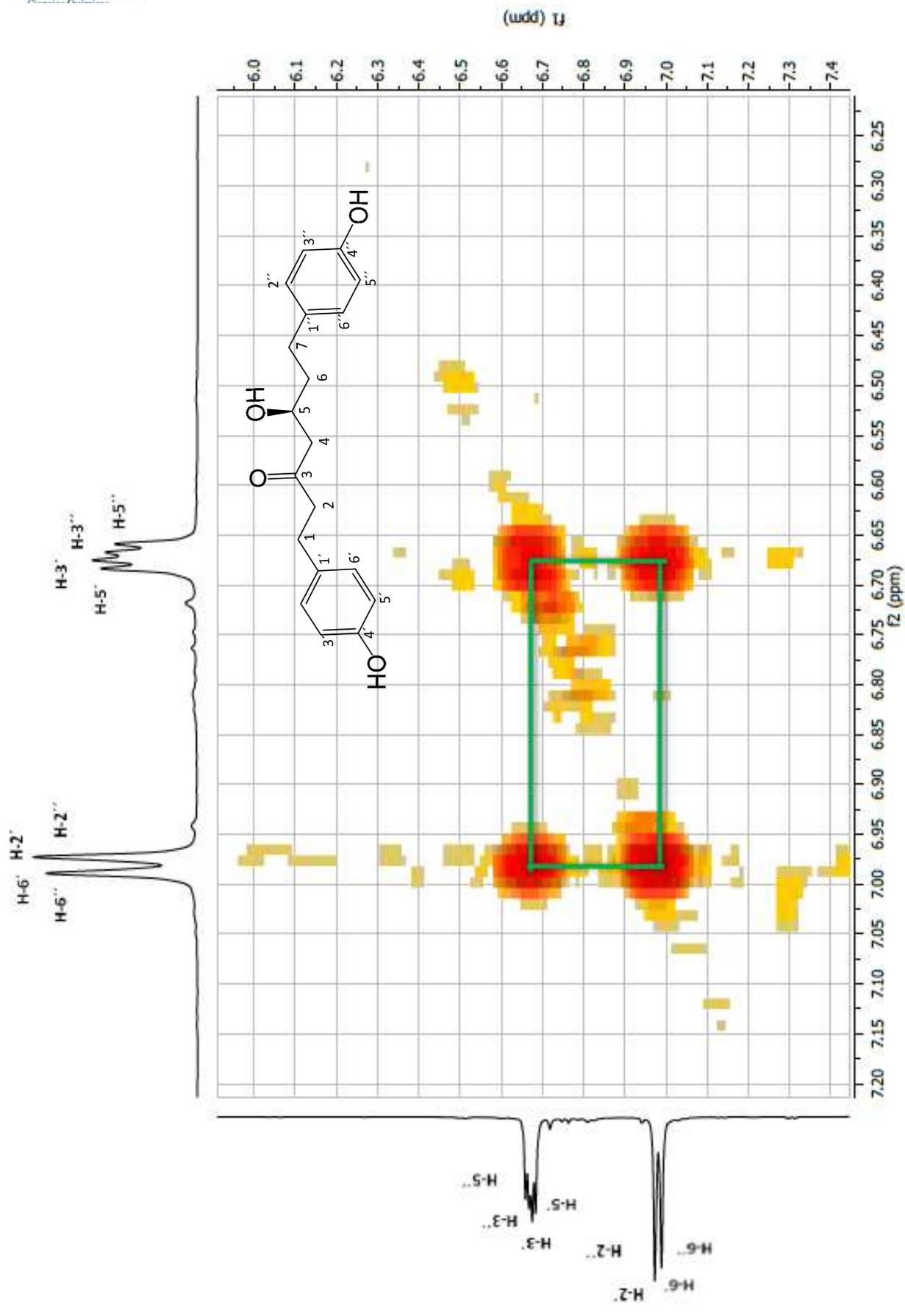
Espectro 25. ^1H - ^1H NOESY de hirsutanonol (ampliación 2).



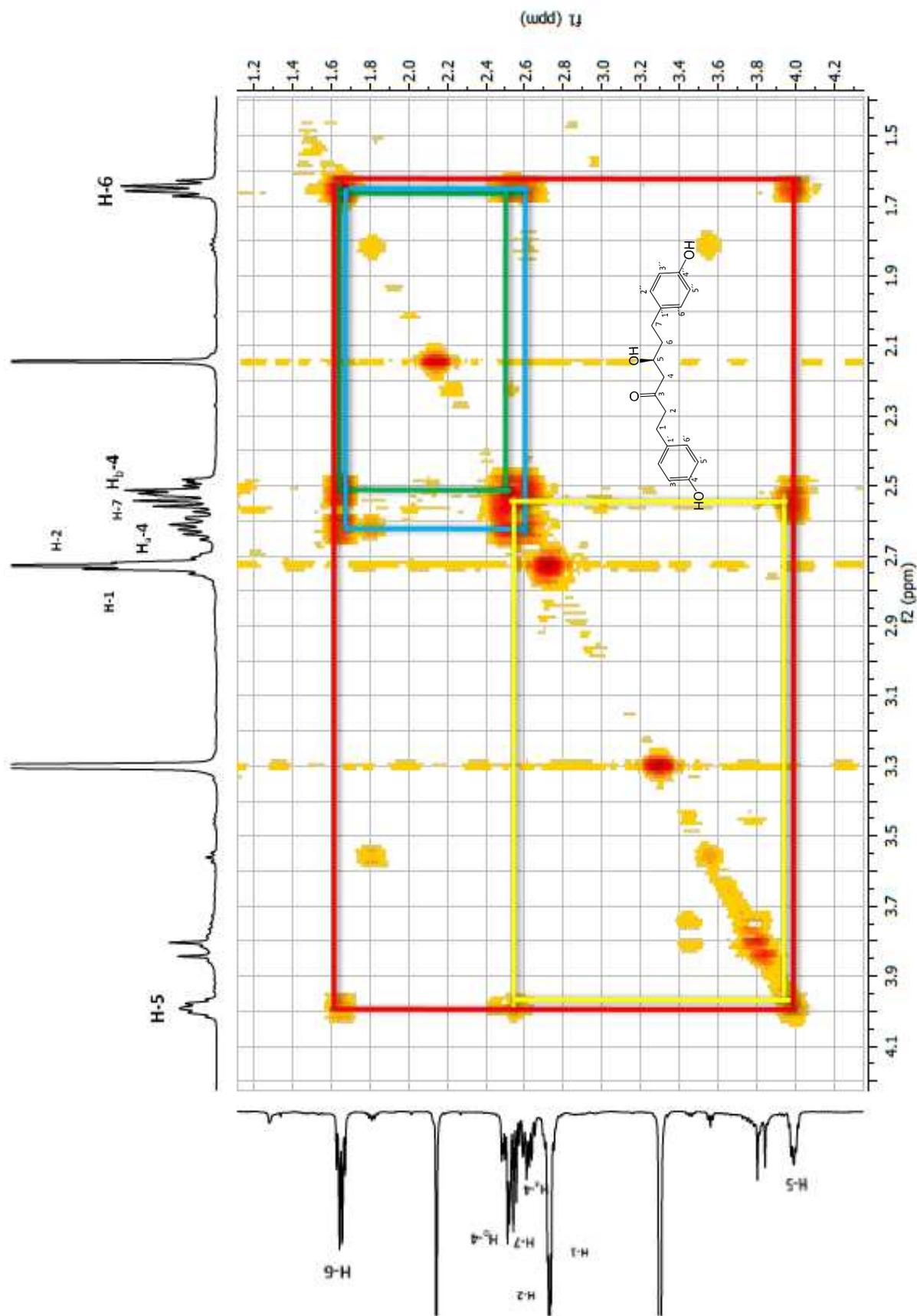
Espectro 26. ¹H-RMN de platifilol, CD₃OD, 500 MHz.



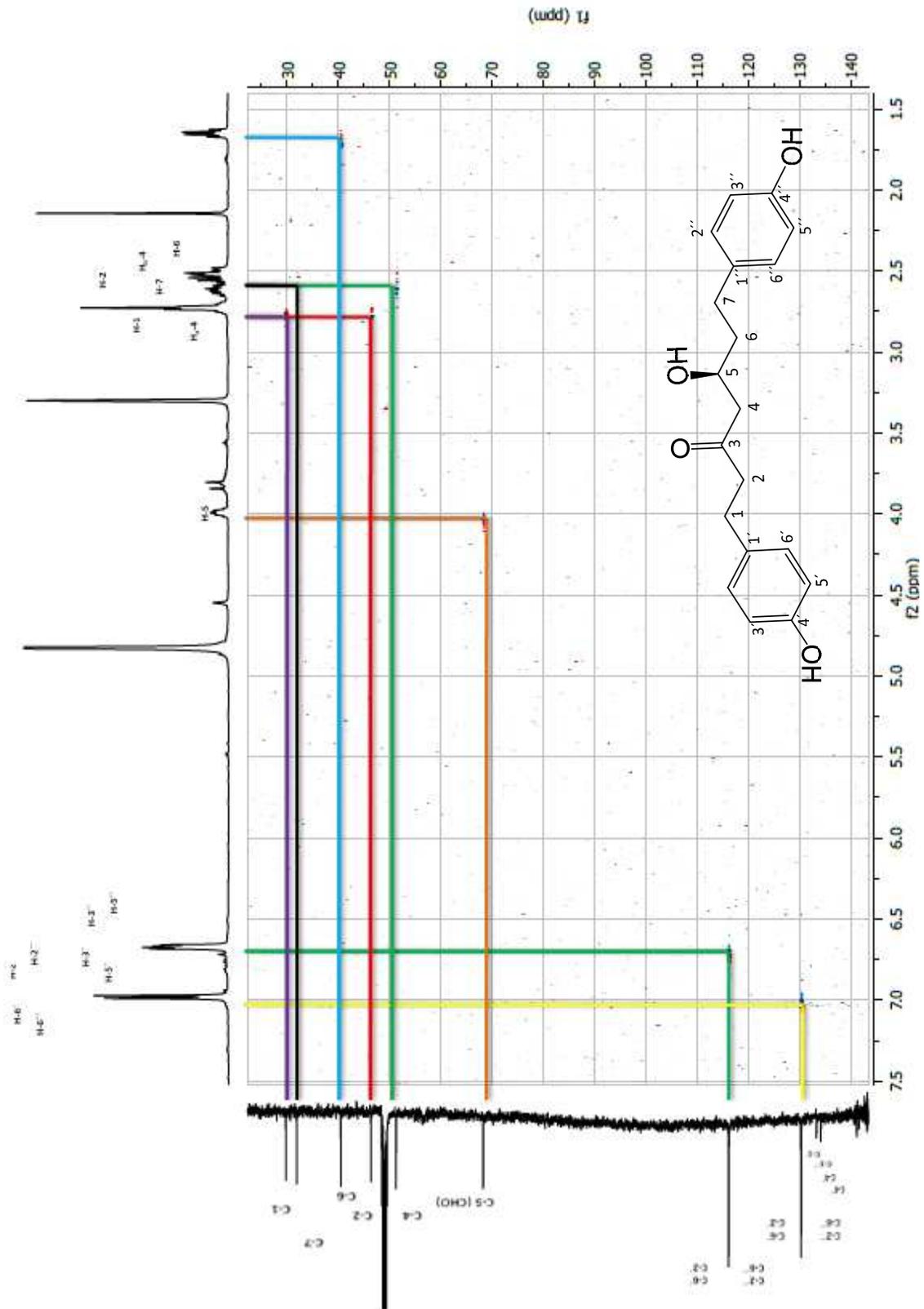
Espectro 27. ^{13}C -RMN de platifilone, CD_3OD , 500 MHz.



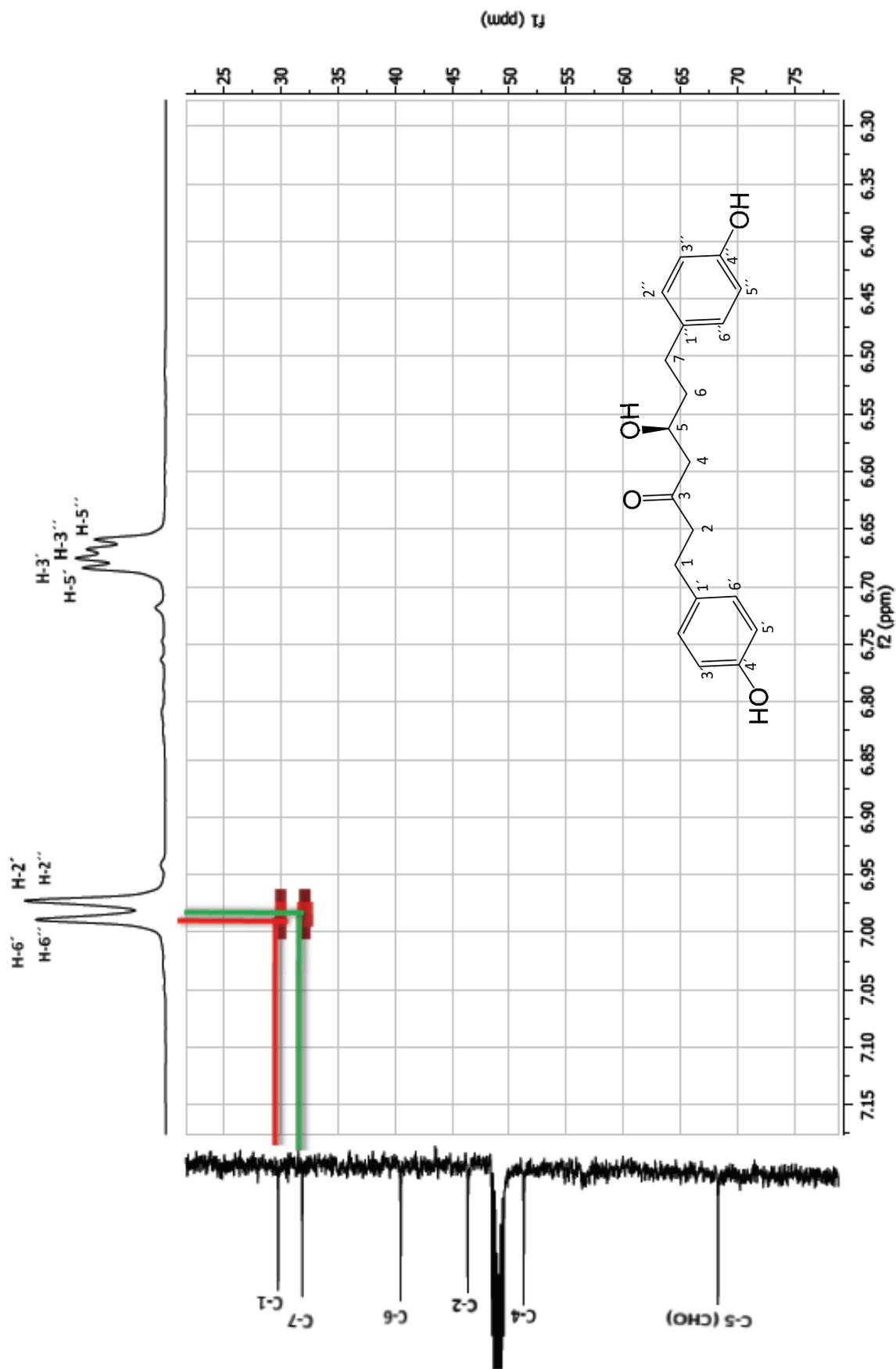
Espectro 28. ^1H - ^1H COSY de platifilol (ampliación 1).



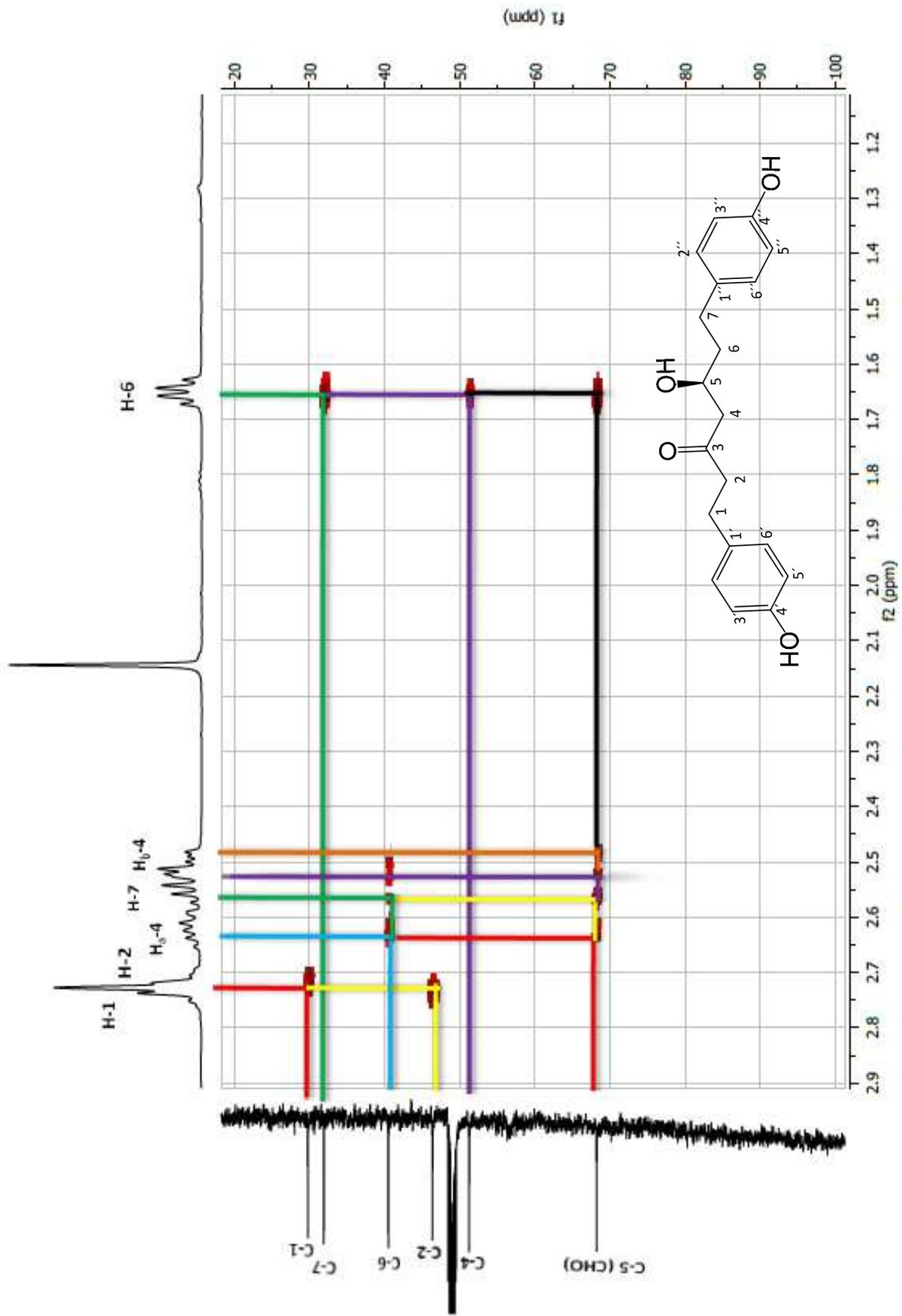
Espectro 29. ^1H - ^1H COSY de platifilanol (ampliación 2).



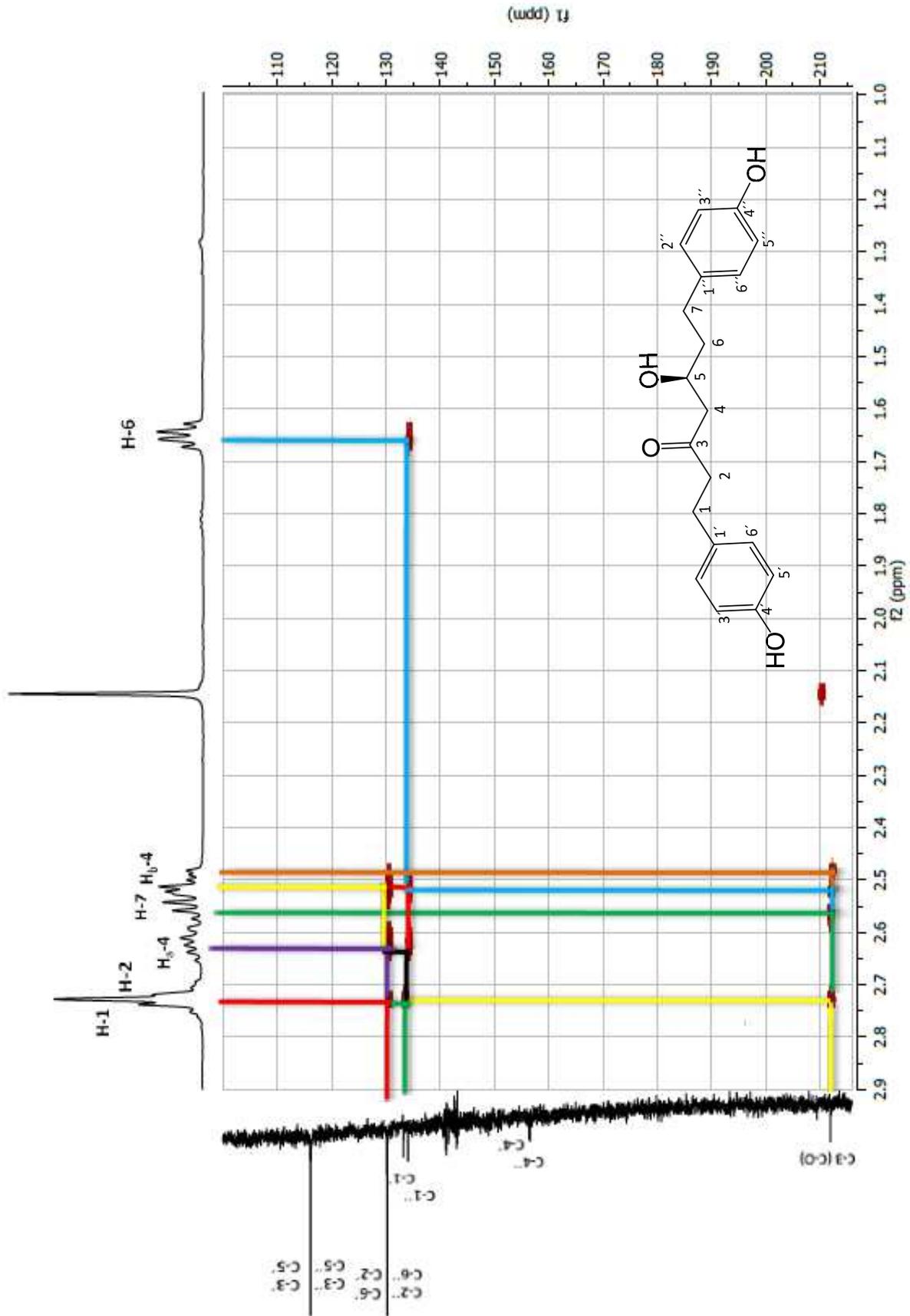
Espectro 30. ^1H - ^{13}C HSQC de platifilonol.



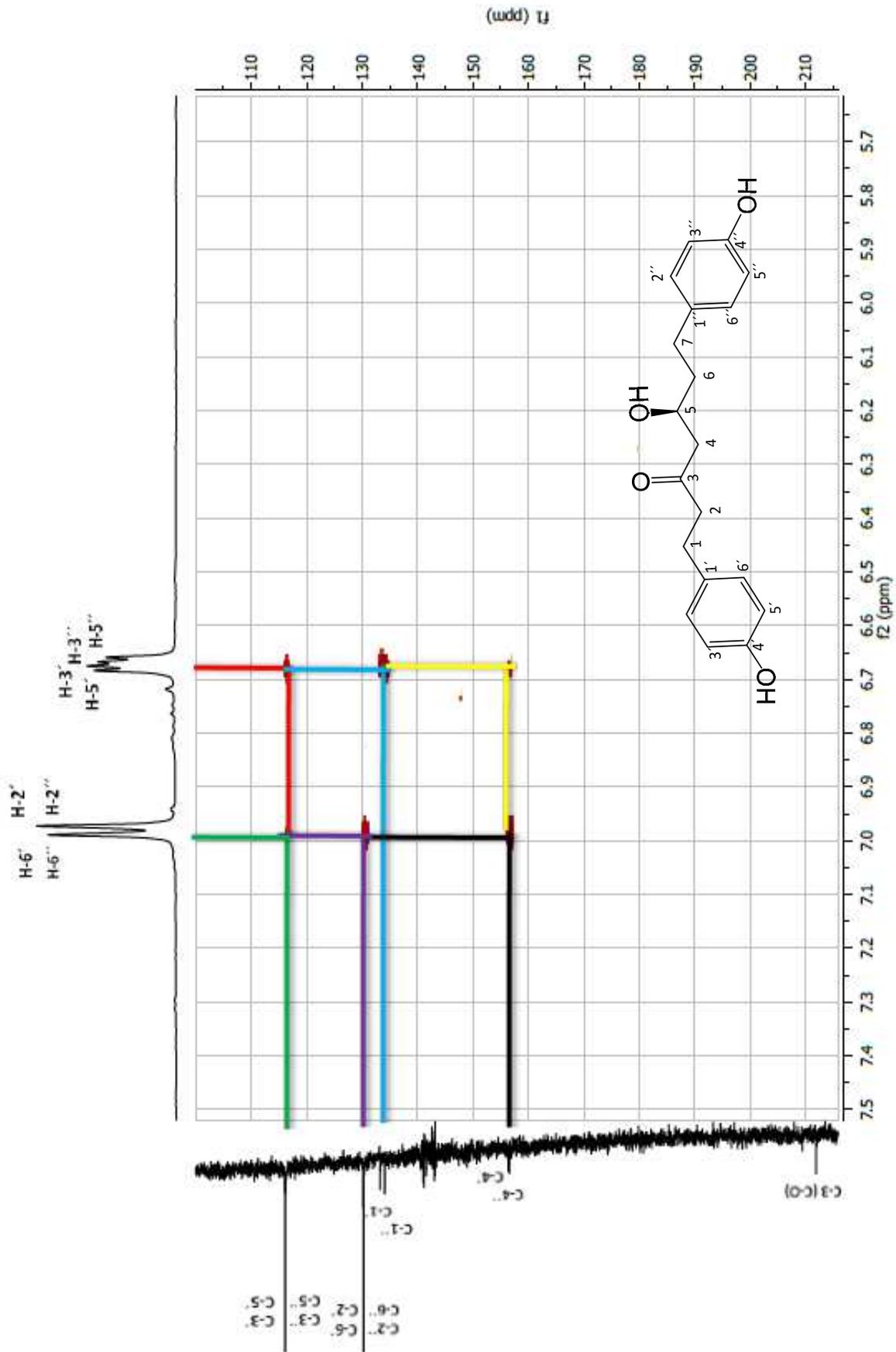
Espectro 31. ^1H - ^{13}C HMBN de platifolone (ampliación 1).



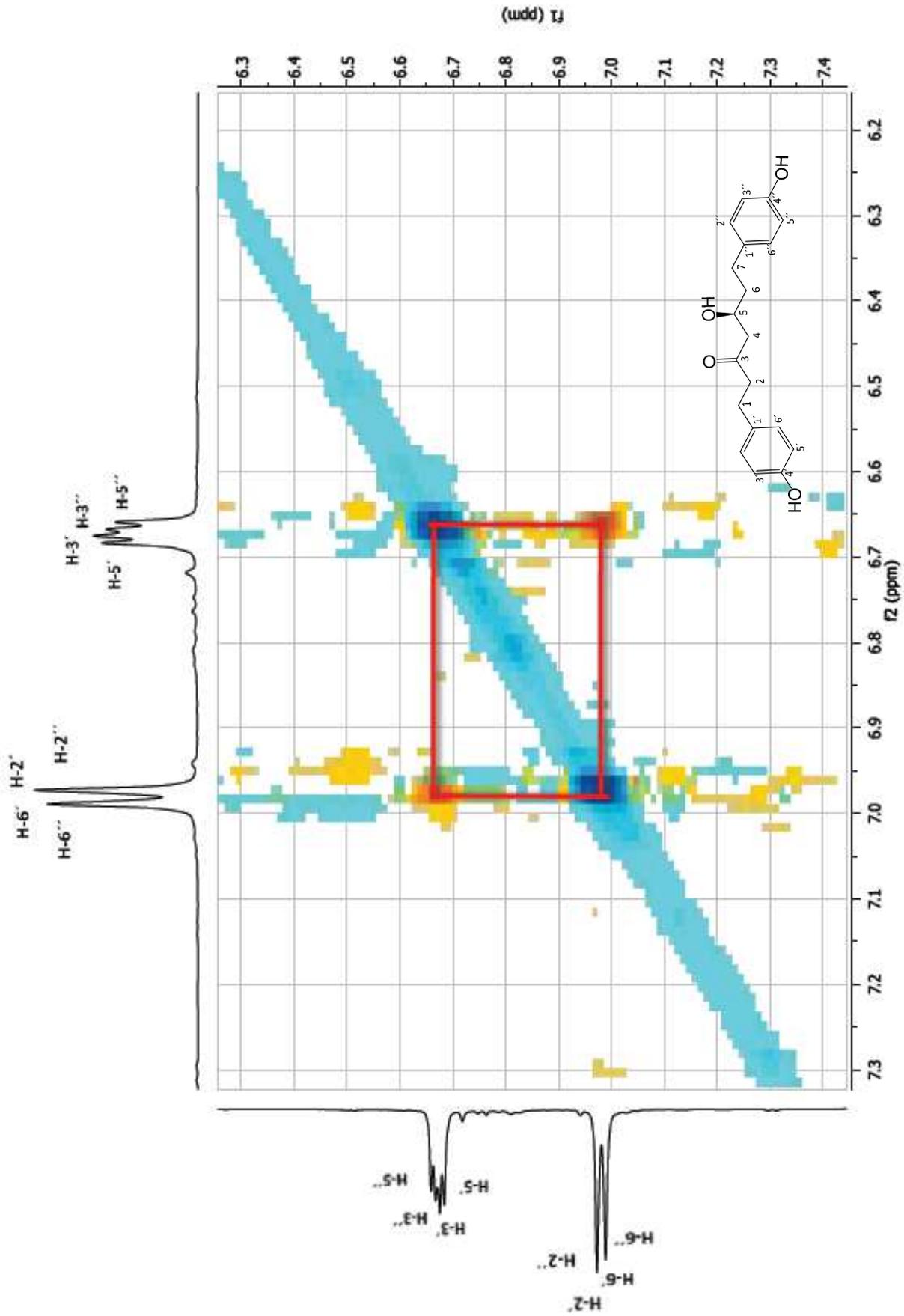
Espectro 32. ^1H - ^{13}C HMBC de platifilone 2 (ampliación 2).



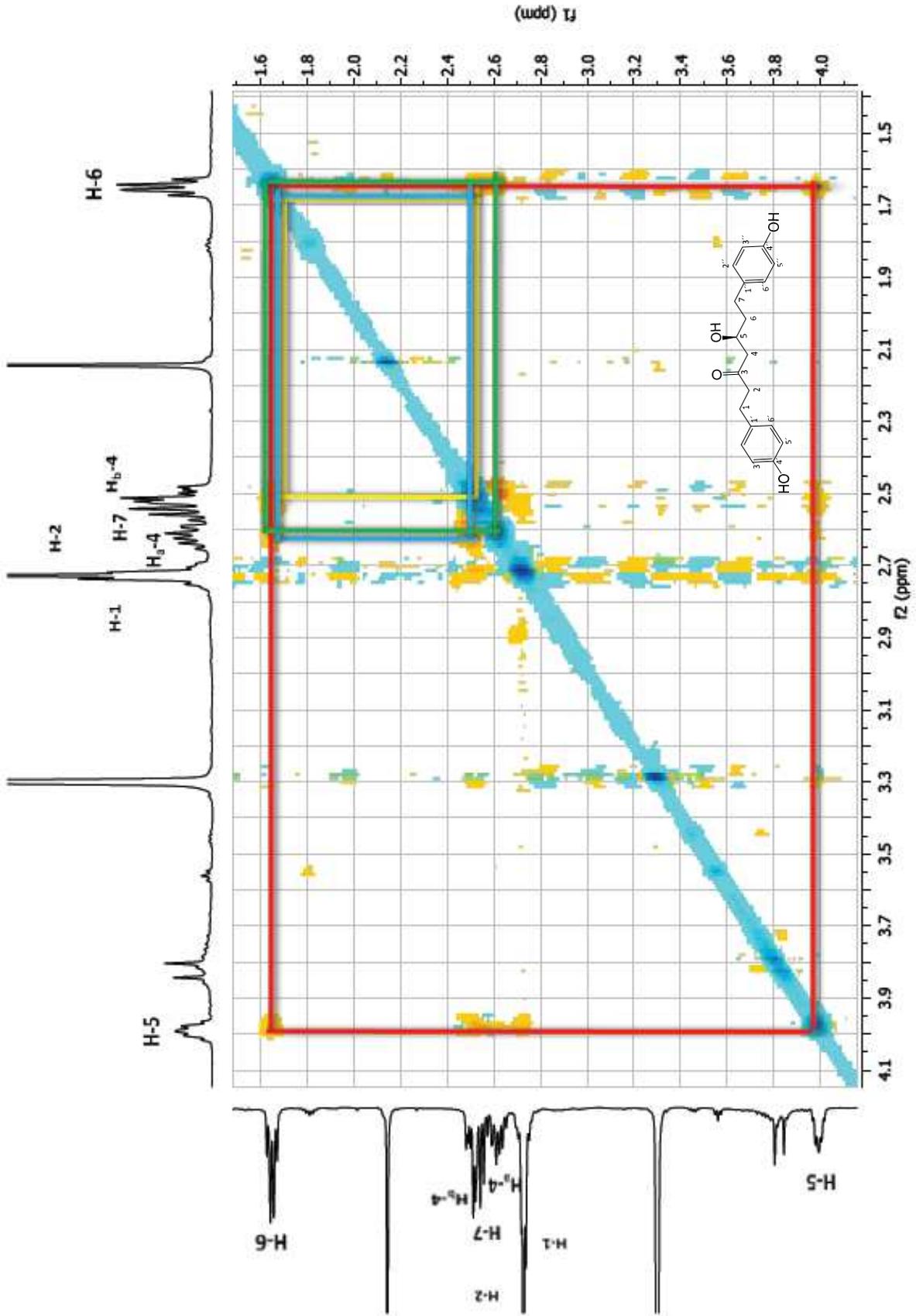
Espectro 33. ^1H - ^{13}C HMBC de platifilanol (ampliación 3).



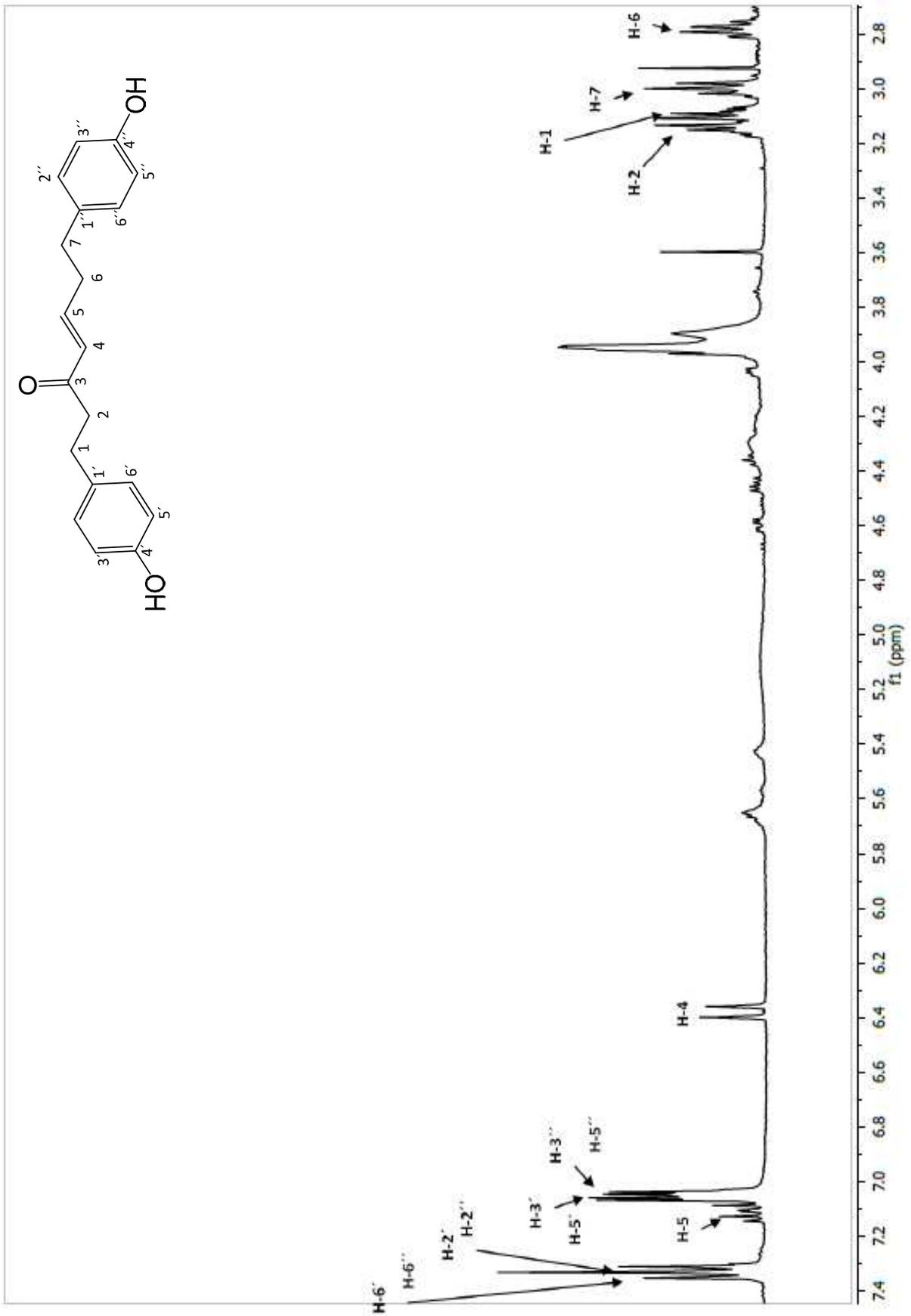
Espectro 34. ^1H - ^{13}C HMBBC de platifilone (ampliación 4).



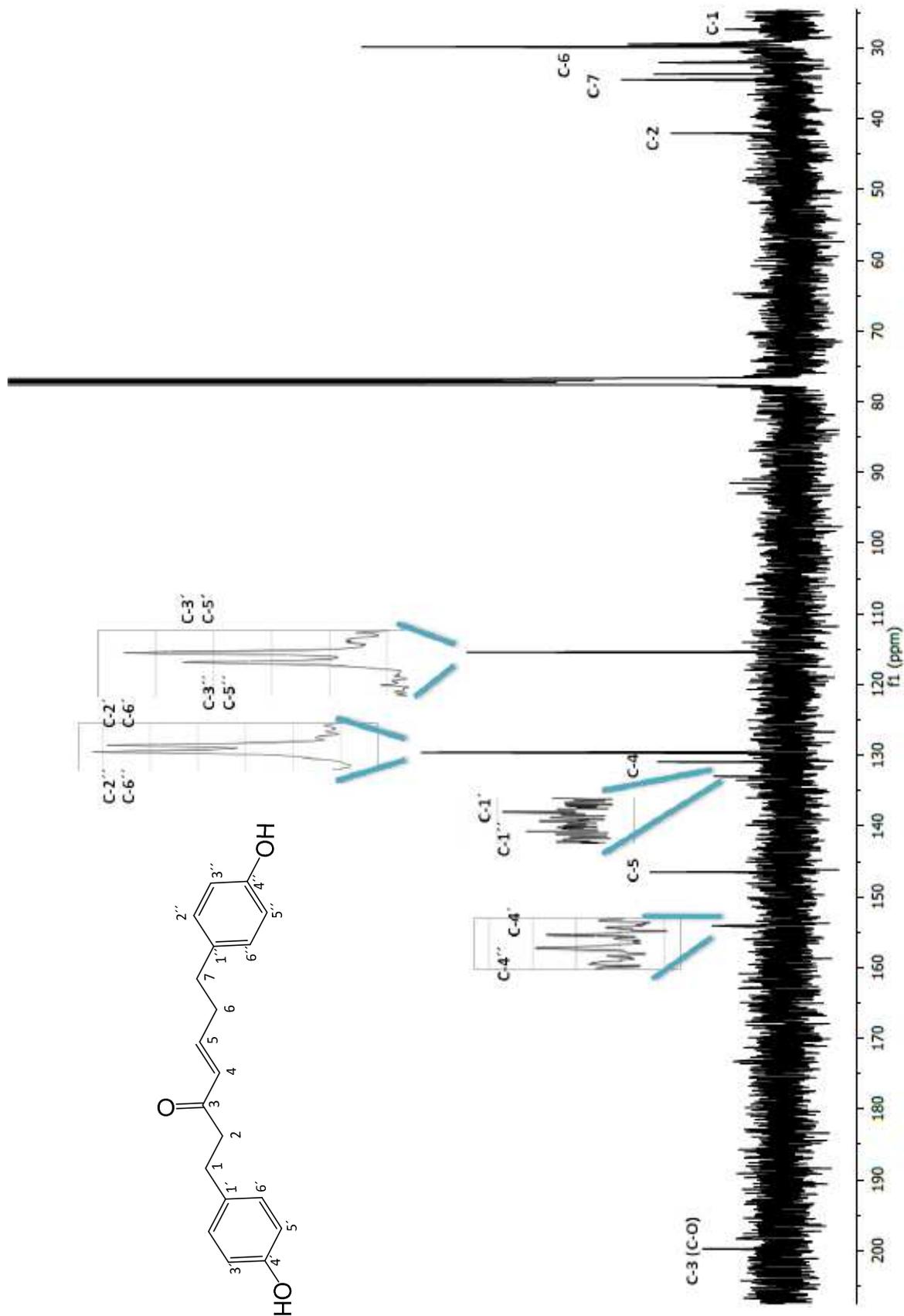
Espectro 35. ^1H - ^1H NOESY de platifilol (ampliación 1).



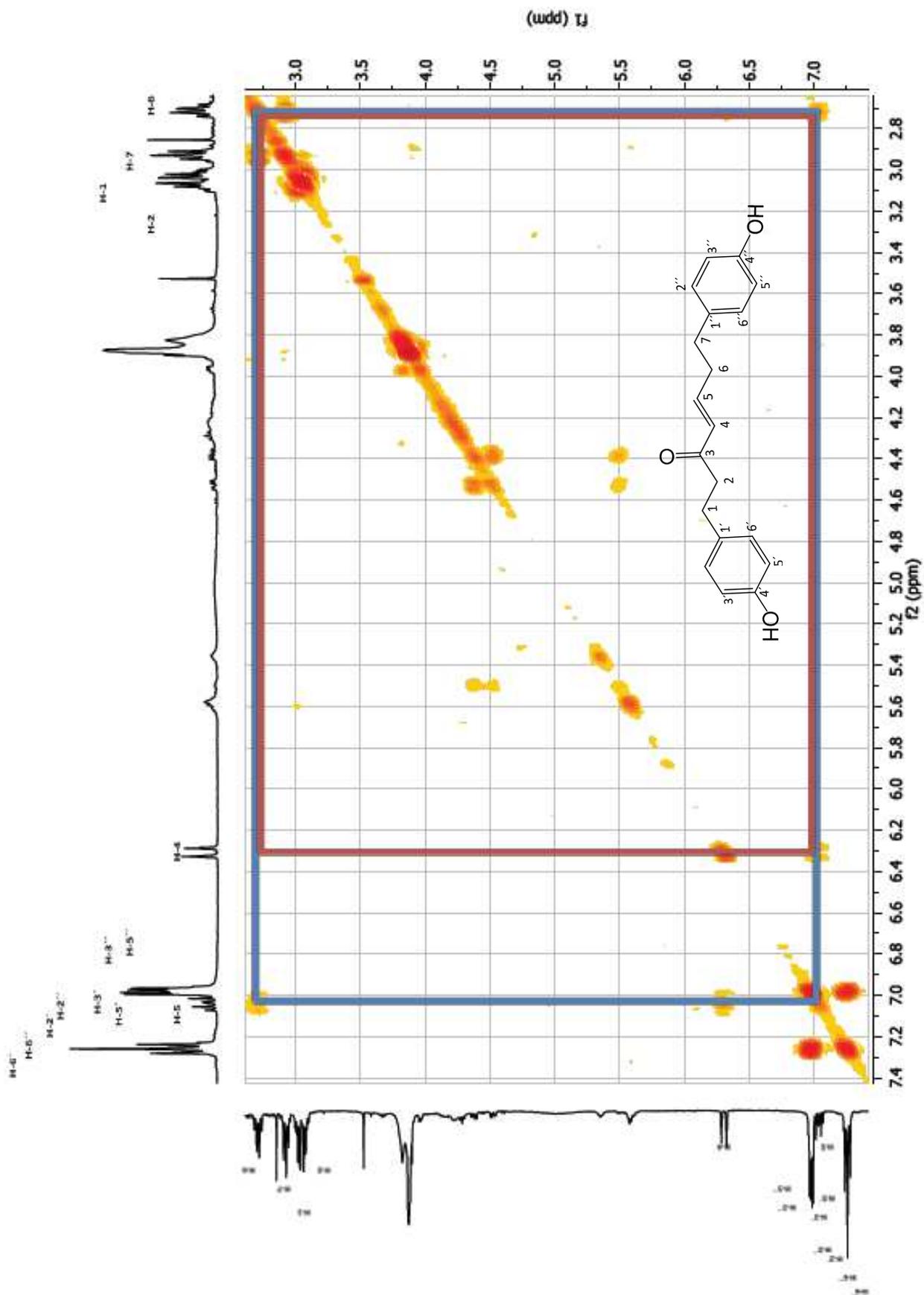
Espectro 36. ^1H - ^1H NOESY de platifilanol (ampliación 2).



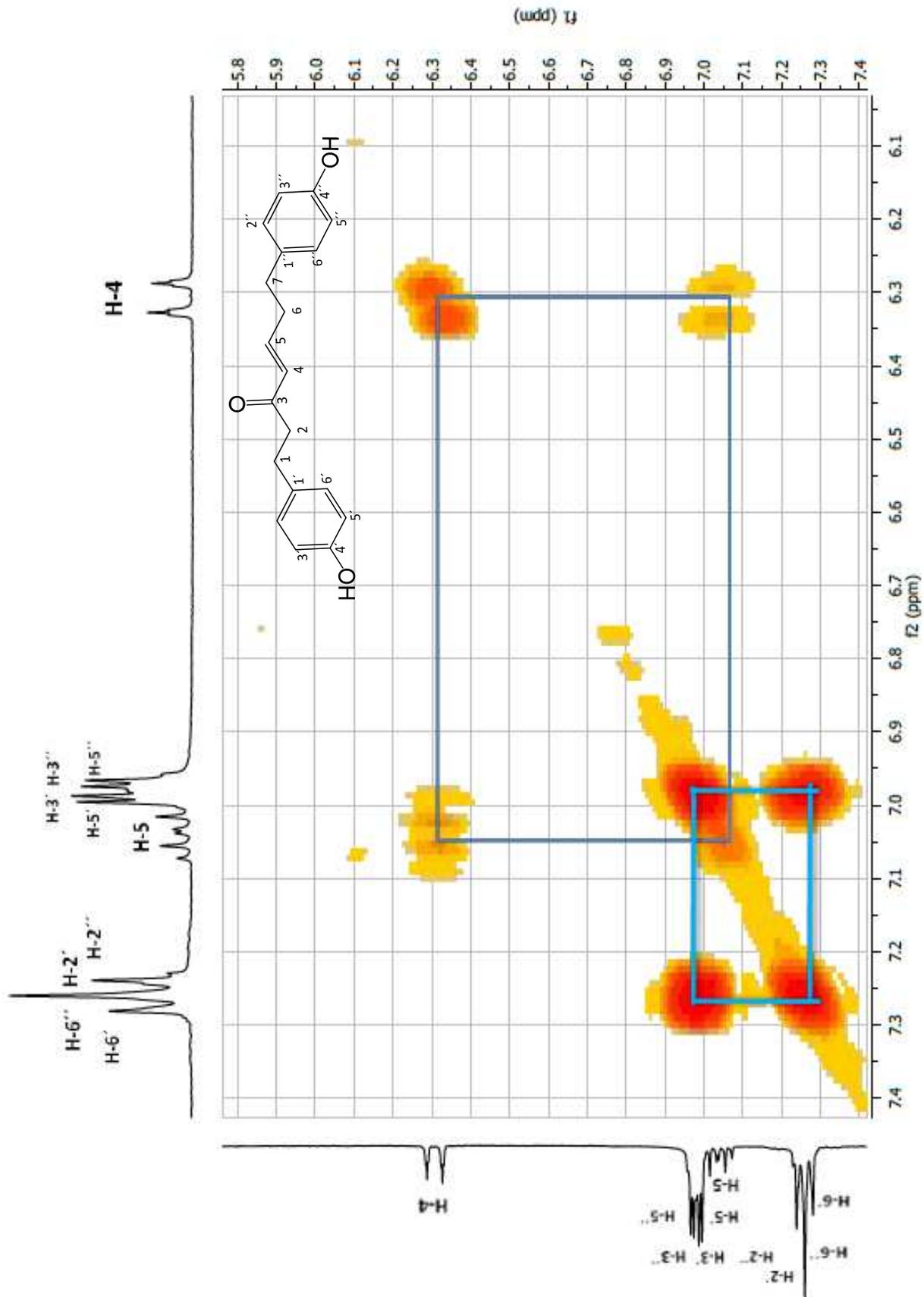
Espectro 37. ¹H-RMN de platifenona, CDCl₃, 400 MHz.



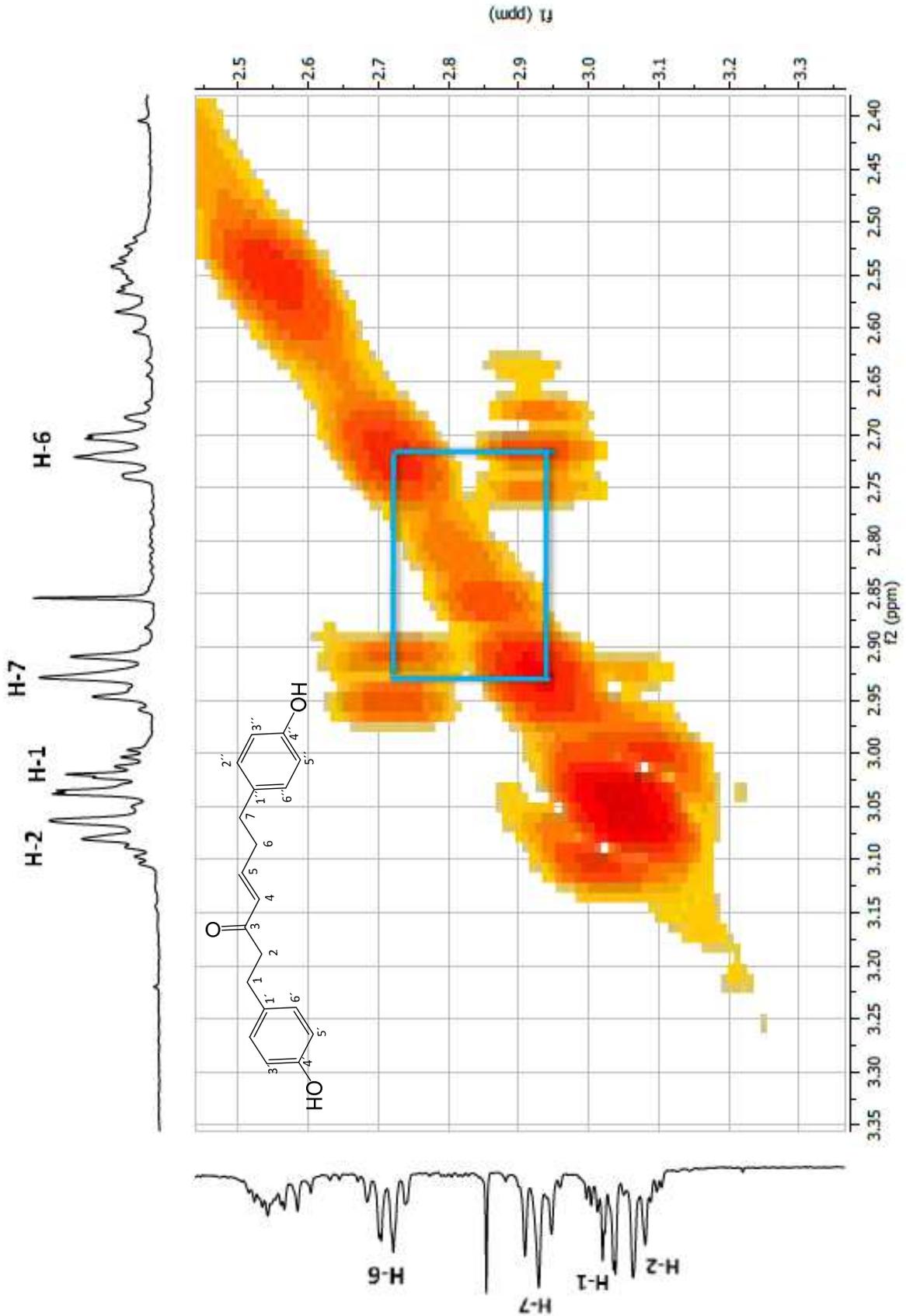
Espectro 38. ¹³C-RMN de platifenona, CDCl₃, 400 MHz.



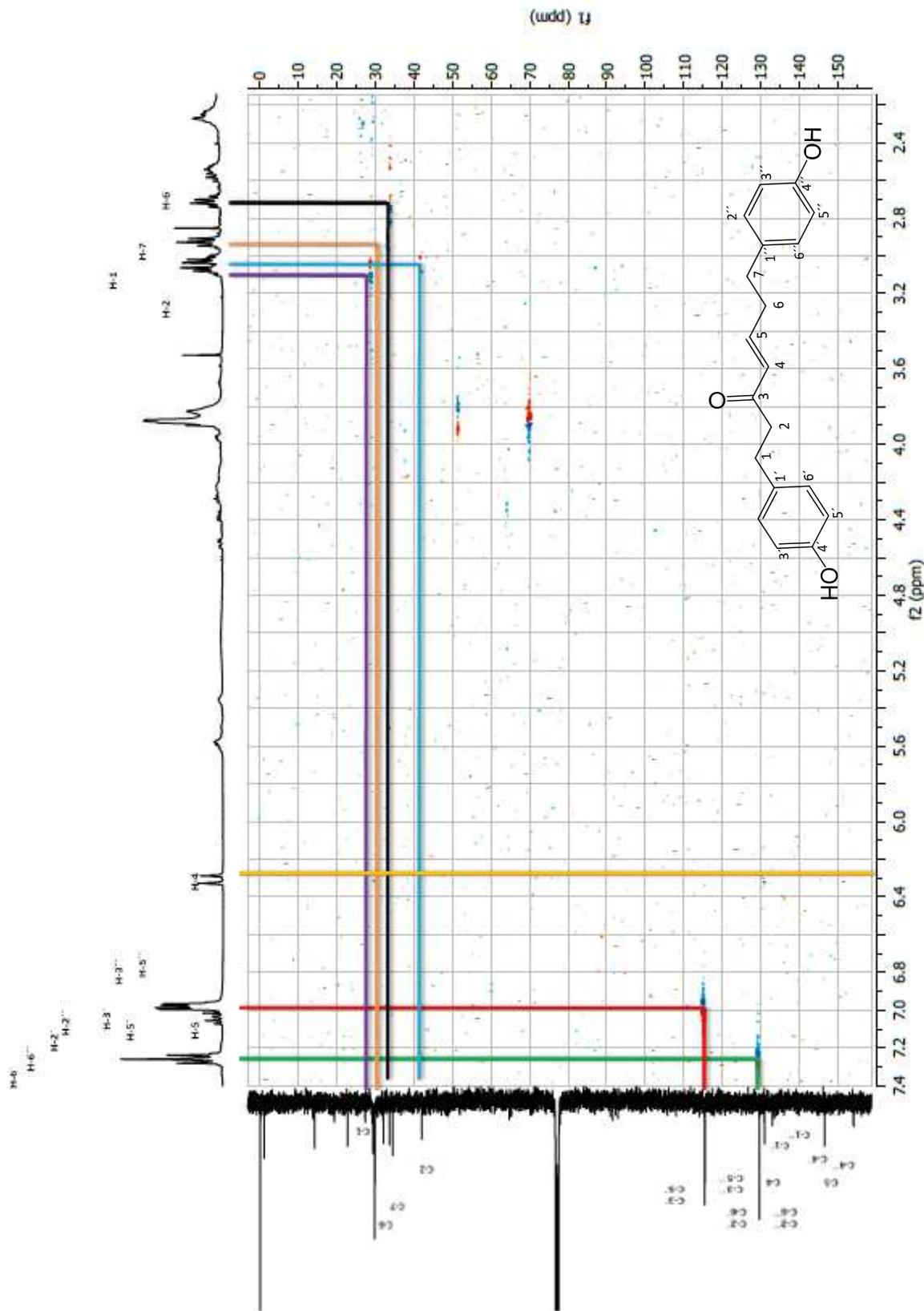
Espectro 39. ^1H - ^1H COSY de platifenona (ampliación 1).



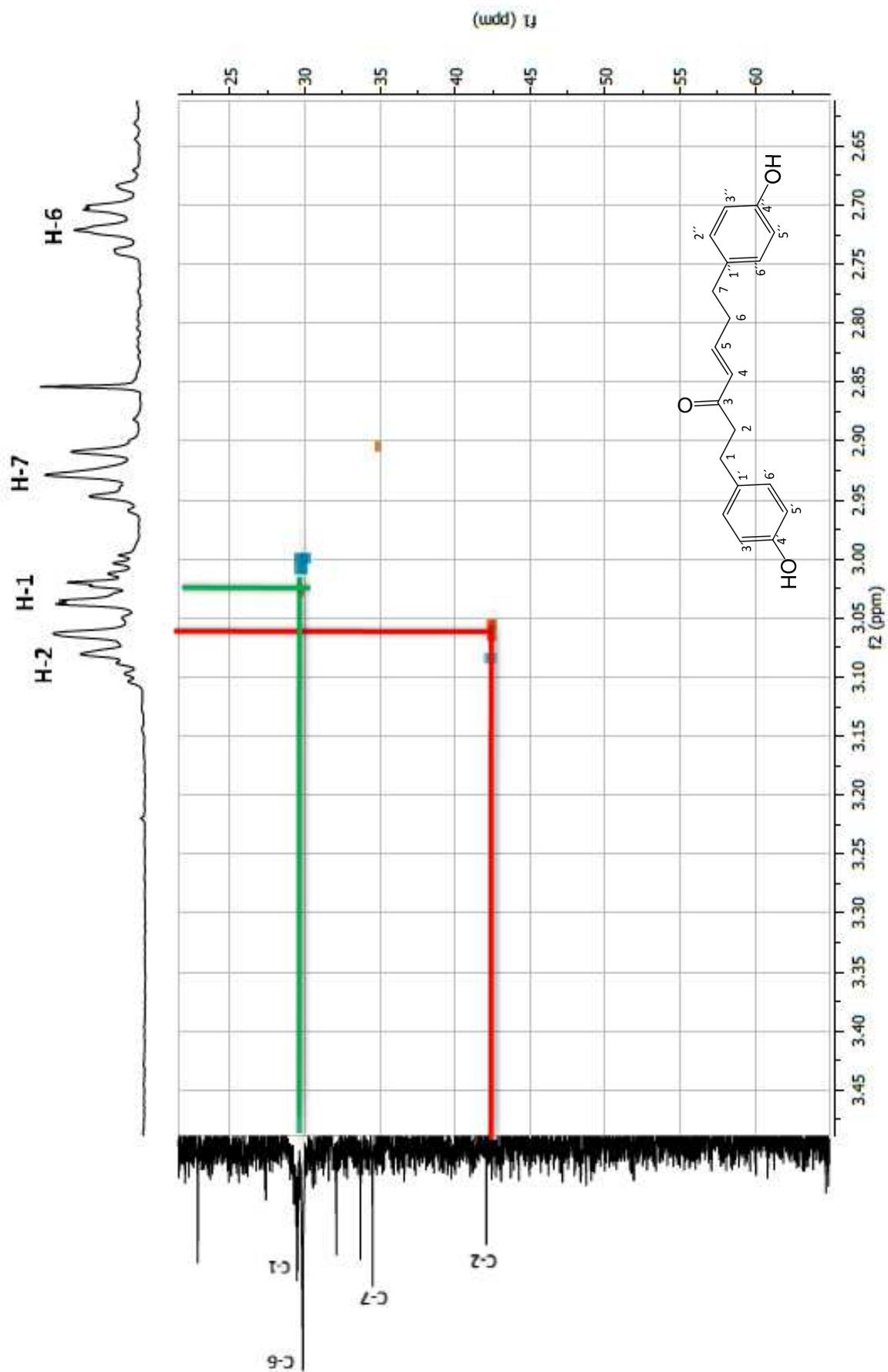
Espectro 40. ^1H - ^1H COSY de platifenona (ampliación 2).



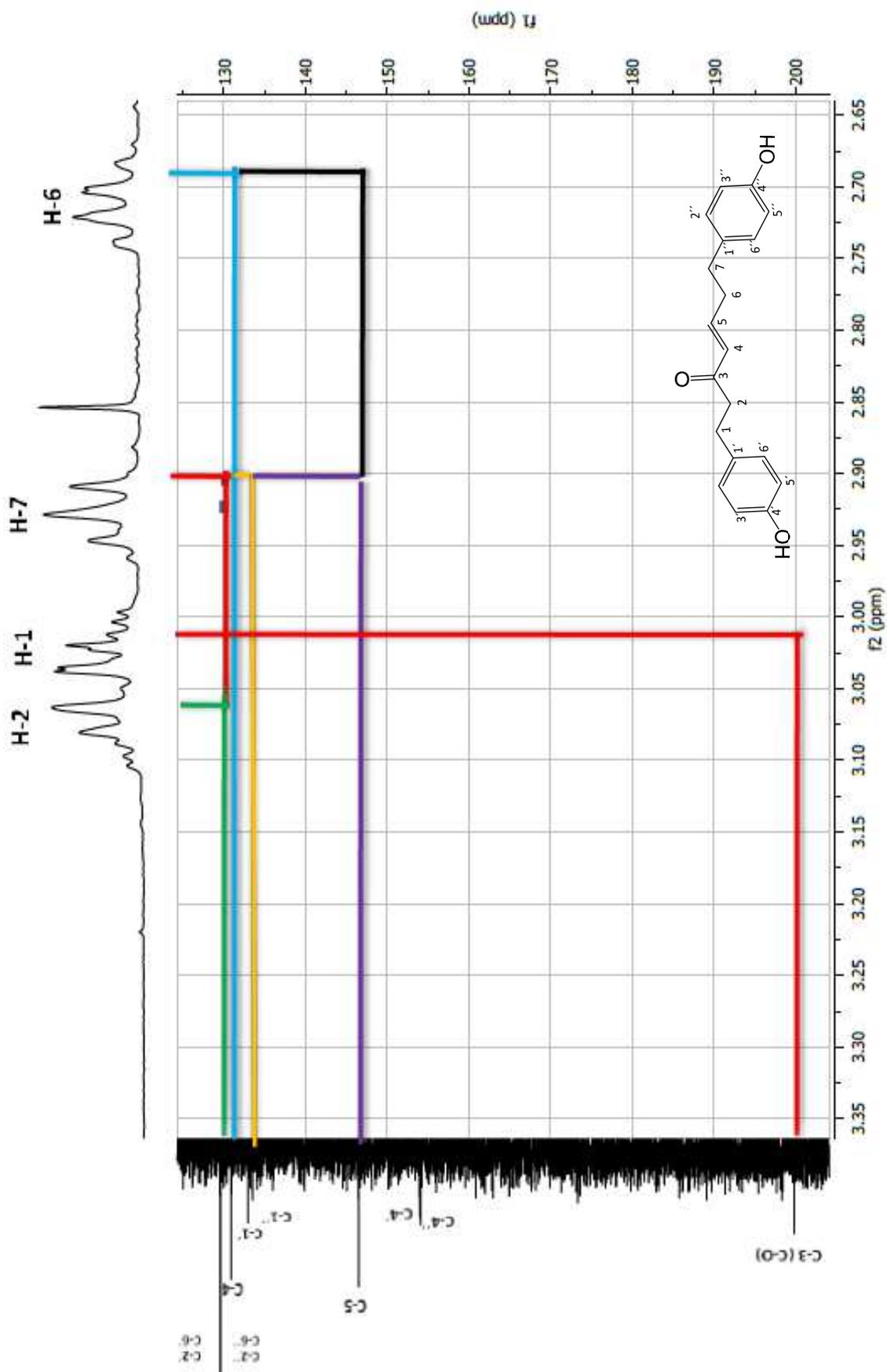
Espectro 41. ^1H - ^1H COSY de platifenona (ampliación 3).



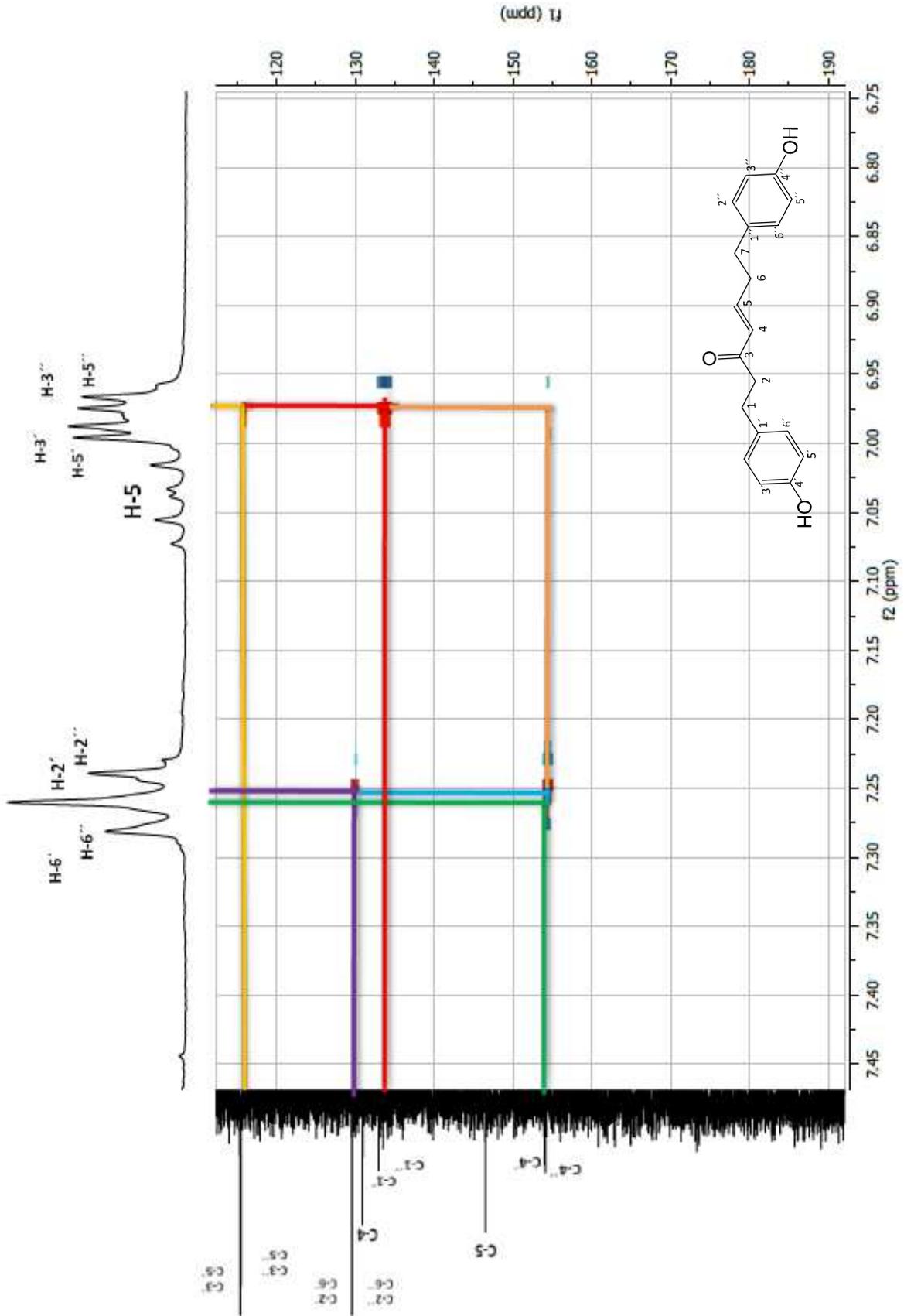
Espectro 42. ^1H - ^{13}C HSQC de platifenona.



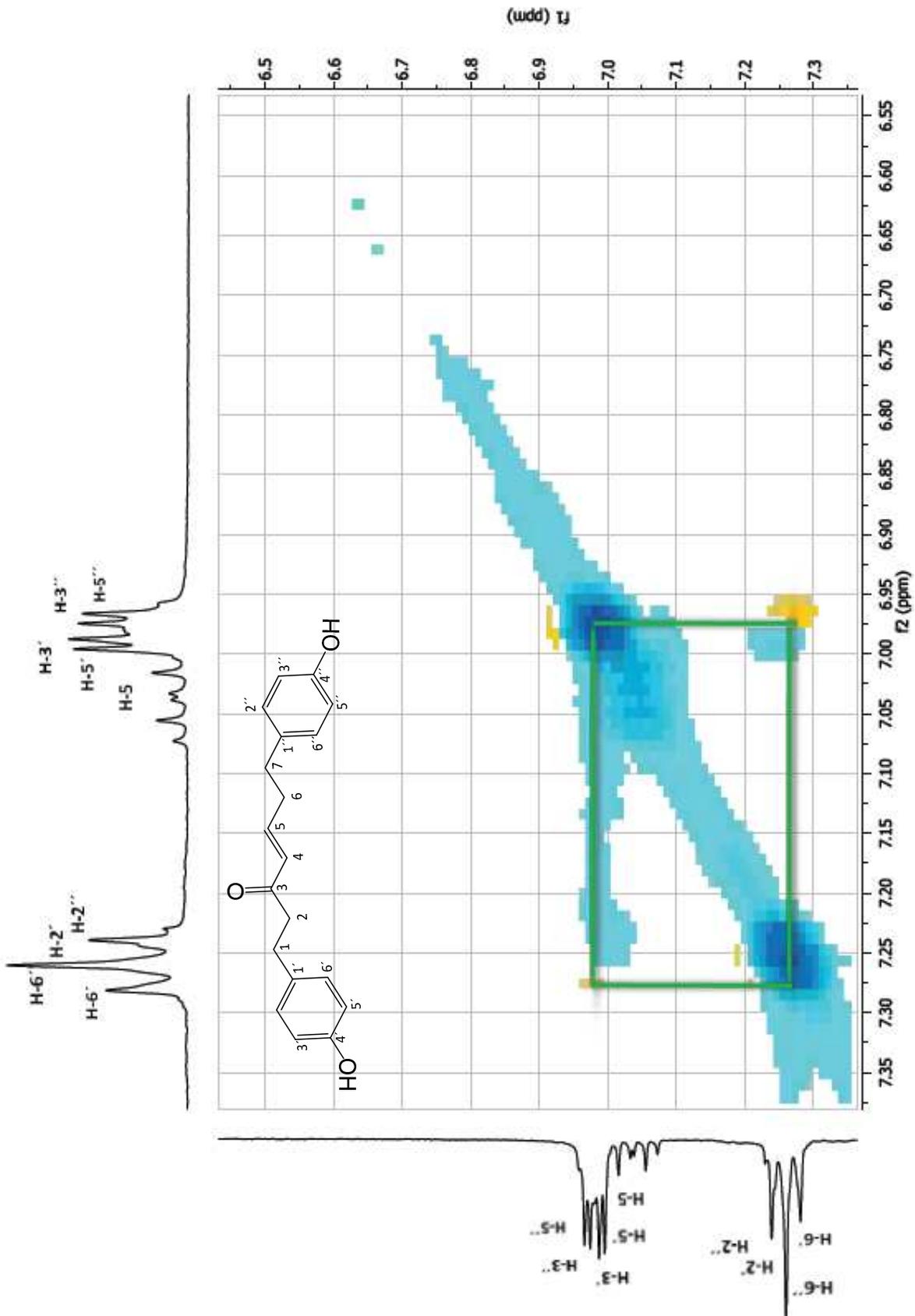
Espectro 43. ^1H - ^{13}C HMBC de platifenona (ampliación 1).



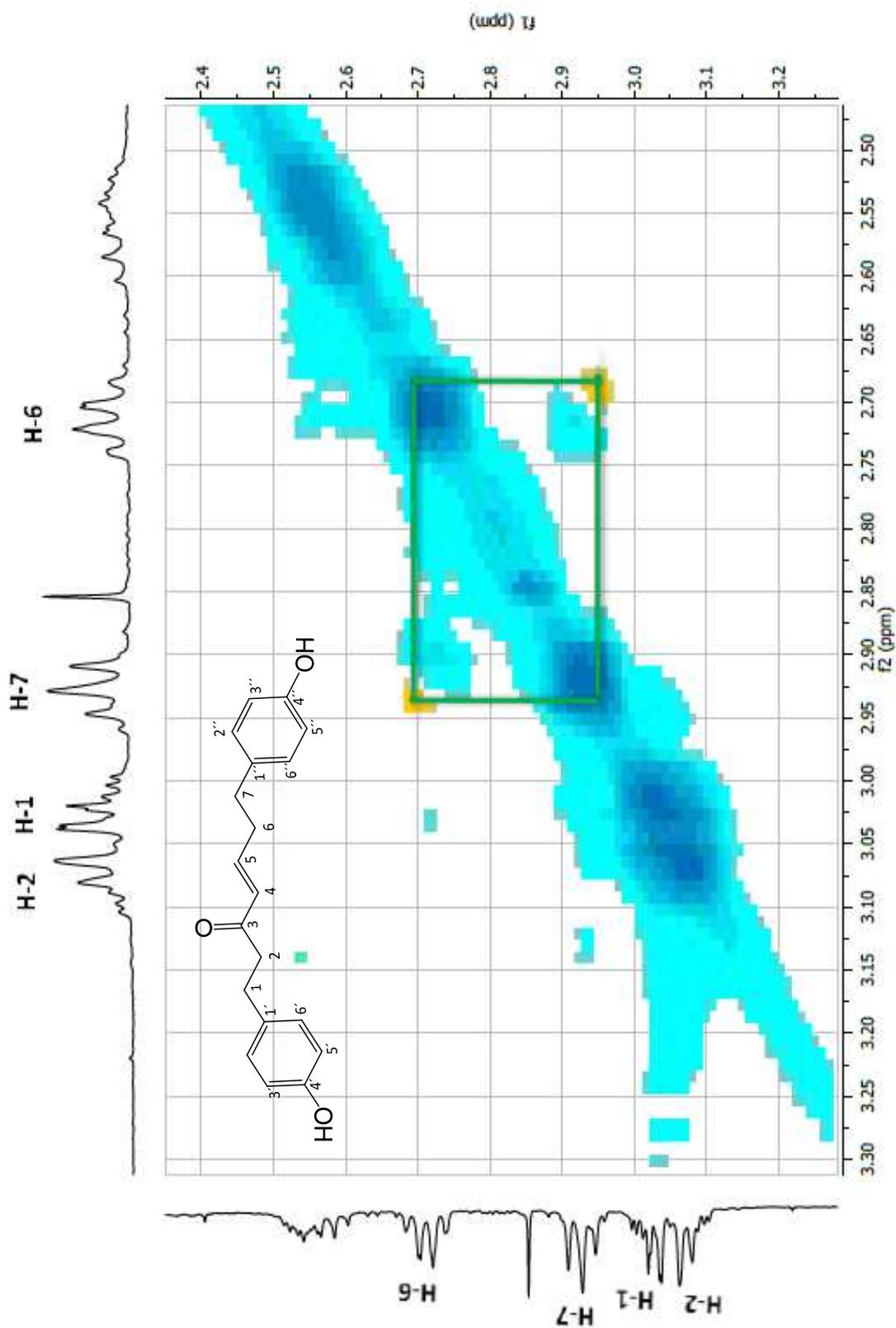
Espectro 44. ^1H - ^{13}C HMBC de platifenona (ampliación 2).



Espectro 45. ^1H - ^{13}C HMBC de platifenona (ampliación 3).



Espectro 46. ^1H - ^1H NOESY de platifenona (ampliación 1).



Espectro 47. ^1H - ^1H NOESY de platifenona (ampliación 2).

14. ANEXO II. Lista de fórmulas estadísticas utilizadas en la validación analítica

Adecuabilidad y precisión del sistema		Linealidad del sistema	
Media aritmética	$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$	Pendiente	$b_1 = \frac{n(\sum xy) - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
Desviación estándar	$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$	Ordenada al origen	$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$
Coefficiente de variación	$\%CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$	Coefficiente de determinación	$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$
		Intervalo de confianza para la pendiente	$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$
			$S_{b1} = S_{xy} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$
Exactitud y repetibilidad del sistema		Linealidad del método	
Media aritmética	$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$	Pendiente	$b_1 = \frac{n(\sum xy) - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
Desviación estándar	$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$	Ordenada al origen	$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$
Coefficiente de variación	$\%CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$	Coefficiente de determinación	$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$
Intervalo de confianza de la media poblacional	$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$	Intervalo de confianza para la pendiente	$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$
		Intervalo de confianza para la ordenada al origen	$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$
			$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$
			$S_{b0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$
			$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$
			$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$
			$\%CV = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} * 100$

Precisión del método
Estabilidad analítica de la muestra
Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Media aritmética del análisis inicial

$$\bar{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Media aritmética para cada condición de almacenaje

$$\bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n_i}$$

Coefficiente de variación

$$\%CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$

Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto al análisis inicial o el frasco

$$|d_i| = |\bar{y}_i - \bar{y}_0|$$

Donde:

 \bar{y} = Media aritmética de la respuesta analítica

 $\sum x$ = Sumatoria de x

 $\sum y$ = Sumatoria de las respuestas analíticas

n = Número de datos

s = Desviación estándar

 $\sum x^2$ = Sumatoria de cuadrados de x

 $\sum y^2$ = Sumatoria de cuadrados de y

 $\sum xy$ = Sumatoria del producto de x con y

CV = Coeficiente de variación

 b_1 = Pendiente

 b_0 = Ordenada al origen

 r^2 = Coeficiente de determinación

 $IC(\beta_1)$ = Intervalo de confianza para la pendiente

 $IC(\beta_0)$ = Intervalo de confianza para la ordenada al origen

 $IC(\mu)$ = Intervalo de confianza para la media poblacional

 $t_{0.975, n-1}$ = t de student de tablas para n-1 grados de libertad con un nivel de confianza de 97.5%

 $t_{0.975, n-2}$ = t de student de tablas para n-2 grados de libertad con un nivel de confianza de 97.5%

 S_{b1} = Desviación estándar de la pendiente

 $S_{y/x}$ = Desviación estándar de la regresión lineal

 $CV_{y/x}$ = Coeficiente de variación debido a la regresión lineal

 \bar{y}_i = Media aritmética de las respuestas de la condición de análisis

 n_i = Número de datos de cada condición de análisis

 $|d_i|$ = Diferencia absoluta de las medias entre cada condición de almacenaje y el análisis inicial o el frasco

Tabla estadística de la distribución t de *student*

Grados de libertad	$t_{0.975}$	Grados de libertad	$t_{0.975}$	Grados de libertad	$t_{0.975}$
1	12.706	18	2.101	35	2.030
2	4.303	19	2.093	36	2.028
3	3.182	20	2.086	37	2.026
4	2.776	21	2.080	38	2.024
5	2.571	22	2.074	39	2.023
6	2.447	23	2.069	40	2.021
7	2.365	24	2.064	41	2.020
8	2.306	25	2.060	42	2.018
9	2.262	26	2.056	43	2.017
10	2.228	27	2.052	44	2.015
11	2.201	28	2.048	45	2.014
12	2.179	29	2.045	46	2.013
13	2.160	30	2.042	47	2.012
14	2.145	31	2.040	48	2.011
15	2.131	32	2.037	49	2.010
16	2.120	33	2.035	50	2.009
17	2.110	34	2.032	51	2.008