



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PRUEBAS ANALÍTICAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA
PLANTA MEDICINAL *ALNUS ACUMINATA* SSP. *ARGUTA*
(*BETULACEAE*) Y ANÁLISIS POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE
SÓLIDA (HS-SPME-CG-EM-TOF) DE LA RAÍZ *HELIOPSIS*
LONGIPES (A. GRAY) S.F. BLACK (*ASTERACEAE*)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
CRISTIAN ALVARADO LÓPEZ



México D. F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. YOLANDA CABALLERO ARROYO
VOCAL: DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS
SECRETARIO: DRA. ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ
1er. SUPLENTE: DRA. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO
2° SUPLENTE: DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDIVAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E
DIVISIÓN DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
CIUDAD UNIVERSITARIA**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

SUSTENTANTE:

CRISTIAN ALVARADO LÓPEZ



Índice

Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	iv
Lista de Tablas	vii
Lista de Gráficos	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Control de calidad de las plantas medicinales	3
2.2. Monografías como marco de referencia para el control de calidad de las plantas medicinales	3
2.3. Parámetros de calidad de las drogas vegetales	4
2.3.1. Ensayos de identidad	5
2.3.2. Pruebas de composición	5
2.3.3. Pruebas de pureza	6
2.4. Generalidades sobre <i>Alnus acuminata</i>	6
2.4.1. Familia <i>Betulaceae</i>	6
2.4.2. Género <i>Alnus</i>	7
2.4.3. Generalidades de <i>Alnus acuminata</i> spp. <i>arguta</i>	7
2.4.3.1. Aspectos botánicos	7
2.4.3.2. Distribución geográfica	8
2.4.3.3. Nombres comunes	9
2.4.3.4. Subespecies	9
2.4.3.5. Usos medicinales y tradicionales	10
2.4.3.6. Antecedentes químicos y farmacológicos	10
2.5. Generalidades sobre <i>Heliopsis longipes</i> (A. Gray) S.F. Black	13
2.5.1. Familia <i>Asteraceae</i>	6
2.5.2. Género <i>Heliopsis</i>	13
2.5.2.1. Aspectos botánicos	13
2.5.2.2. Distribución geográfica	14
2.5.2.3. Nombres comunes	15



2.5.2.4. Usos medicinales y tradicionales	15
2.5.2.5. Antecedentes químicos y farmacológicos	15
2.6. Antioxidantes.....	16
2.6.1. Clasificación	16
2.6.2. Compuestos fenólicos	17
2.6.3. Relación estructura química – actividad antioxidante.....	18
2.7. Ensayos para la determinación de compuestos fenólicos.....	19
2.7.1. Ensayo de Folin-Ciocalteu	19
2.7.2. Ensayo de la vainillina	20
2.8. Medición de la capacidad antioxidante.....	21
2.8.1. Ensayo del DPPH.....	21
2.8.2. Ensayo del ABTS	22
2.8.3. Ensayo de la Capacidad Antioxidante/Reductor de hierro (FRAP)	22
2.9. Otros ensayos asociados con el atrapamiento de electrones y radicales libres	24
2.9.1. Ensayo de Oxidación de hierro-Anaranjado de xilenol (FOX) 24	
2.9.2. Ensayo del tiocianato férrico (FTC)	24
2.9.3. Ensayo del aldehído/ácido carboxílico	24
2.10. Ensayos asociados con la peroxidación de lípidos	25
2.10.1. Ensayo de blanqueamiento del β -caroteno	25
2.11. Otros ensayos antioxidantes relacionados a la peroxidación de lípidos	24
2.11.1. Ensayo del ácido tiobarbitúrico.....	25
2.11.2. Ensayo del dieno conjugado	25
2.12. Microextracción en fase sólida (SPME).....	27
2.12.1. Procedimiento de la microextracción en fase sólida.....	28
2.12.2. Variables que afectan el proceso de SPME	30
2.12.3. Índice de retención de Kovats	31



3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivos generales	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN	33
5. MATERIALES	34
5.1. Materia vegetal.....	34
5.2. Disolventes y reactivos.....	35
5.3. Equipos	36
6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	37
6.1. Ensayos de identidad	37
6.2. Determinación del contenido de antioxidantes en <i>Alnus acuminata</i>	39
6.3. Ensayos de capacidad antioxidante	44
6.4. Determinación de compuestos volátiles por HS-SPME-EM-TOF de la corteza de <i>A. acuminata</i> y de la raíz de <i>H. longipes</i>	47
7. RESULTADOS	49
7.1. Ensayos de identidad	49
7.2. Determinación de contenido de fenoles totales.....	50
7.3. Ensayos de la capacidad antioxidante	56
7.4. Determinación de compuestos volátiles por HS-SPME-EM-TOF de la corteza de <i>A. acuminata</i> y de la raíz <i>H. longipes</i>	65
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	73
8.1. Ensayos de identidad	73
8.2. Determinación de contenido de fenoles totales.....	73
8.3. Ensayos de capacidad antioxidante	74
8.4. Determinación de compuestos volátiles por HS-SPME-EM-TOF de la corteza de <i>A. acuminata</i> y de la raíz <i>H. longipes</i>	80
9. CONCLUSIONES	82
10. PERSPECTIVAS	83
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
12. ANEXOS	94

**Lista de Abreviaturas**

Abreviatura	Significado
μg	Microgramo
μL	Microlitro
Abs ó A	Absorbancia
%AA	Porcentaje de actividad antioxidante
ABC	Área bajo la curva
ABTS	2,2-azinobis (3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico)
AG	Ácido gálico
AcOEt	Acetato de etilo
A_{mtra}	Absorbancia muestra
A_{ref}	Absorbancia referencia
BHA	<i>ter</i> -butilhidroxianisol
BHT	<i>ter</i> -butilhidroxitolueno
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
C	Concentración o cantidad
CAR	Carboxeno
CCF	Cromatografía en capa fina
CG (GC)	Cromatografía de gases
CLAE (HPLC)	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
CI_{50}	Concentración Inhibitoria Media
%C.V.	Coefficiente de variación
CW	Carbowax
EAG	Equivalentes de ácido gálico
F	Factor de dilución
DB-5	Fenil-polimetilsiloxano (5%)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DPPH·	Radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DR_c	Rapidez de degradación del control
DR_s	Rapidez de degradación de la muestra
DS (SD)	Desviación estándar
DVB	Divinilbenceno
e^-	Electrón
EA	Eficiencia antirradical
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM (MS)	Espectrometría de masas
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
ESR	Resonancia de Espín Electrónico
ET	Transferencia de electrón
EtOH	Etanol/etanólico



Exto.	Extracto
F	F de Fisher
Fe ²⁺	Ion hierro (II)
Fe ³⁺	Ion hierro (III)
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
FOX	Oxidación del hierro / naranja de xilenol
FRAP	Poder antioxidante/reductor del hierro
FTC	Ensayo del tiocianato férrico
g	Gramo
H ⁺	Ion hidrógeno (protón)
HAT	Transferencia del átomo de hidrógeno
Hex	Hexano/hexánico
H ₂ O	Agua
HS	Head space (espacio de cabeza)
IE	Ionización electrónica
IK	Índice de Kovats
IP	Índice presuntivo
IR	Índice de retención
IR _e	Índice de retención experimental
IR _t	Índice de retención teórico
λ	Longitud de onda
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de sodio
LOO·	Radical de peróxido lipídico
LOOH	Peróxido lipídico
LOX	Lipooxigenasa
m	Masa
MeOH	Metanol/metanólico
min	Minuto
mL	Mililitro
mg	Miligramo
mM	Milimolar
m/z	Relación masa/carga
#	Número
NaCO ₃	Carbonato de sodio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
NPD	Detector de fósforo-nitrógeno
OMS	Organización Mundial de la Salud



PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
ppm	Partes por millón
r	Factor de correlación
R.T.	Tiempo de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SPME	Microextracción en fase sólida
spp.	Subespecie
TBHQ	<i>ter</i> -butilhidroxiquinona
TEAC	Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TOF	Tiempo de vuelo
Trolox	(+)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico
u.a.	Unidades de absorbancia
USAI	Unidad de Servicio y Apoyo a la Investigación
UV	Ultravioleta
VIS	Visible
z	Carga



Lista de Figuras

Figura 1. Representación de un árbol típico de <i>Alnus acuminata</i> spp. <i>arguta</i> (Schlechtendal) Furlow, junto con sus hojas, frutos y brotes basales	8
Figura 2. Distribución natural de <i>Alnus acuminata</i> spp. <i>arguta</i> (Schlechtendal) Furlow en América central y México.....	9
Figura 3. Representación de la planta <i>Heliopsis longipes</i> (A. Gray) S.F. Blake junto con la raíz	14
Figura 4. Estructura química de la afinina, como uno de los metabolitos secundarios mayoritarios en la raíz de <i>Heliopsis longipes</i> (A. Gray) S.F. Blake ...	15
Figura 5. Estructura química de un flavonoide con el grupo catecol	19
Figura 6. Reacción de Folin-Ciocalteu.....	20
Figura 7. Reacción para la identificación de flavonoides por medio de la vainillina sulfúrica	20
Figura 8. Reacción entre el radical DPPH y una sustancia antioxidante	21
Figura 9. Reacción de formación del radical ABTS con $K_2S_2O_8$	22
Figura 10. Reacción de formación del complejo (Fe^{2+} – TPTZ) a partir del (Fe^{3+} - TPTZ)	23
Figura 11. Reacción de formación del complejo (Fe^{3+} – naranja de xileno) a partir del Fe^{2+} oxidado	24
Figura 12. Reacción de formación de los aductos de β -caroteno y un antioxidante con el radical peroxilo.....	25
Figura 13. Representación del dispositivo comercial de SPME.....	27
Figura 14. Representación del funcionamiento de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas para la técnica de microextracción	28



Figura 15. Representación del proceso de absorción de los analitos en el dispositivo de SPME	29
Figura 16. Representación del proceso de desorción de los analitos en el dispositivo de SPME	30
Figura 17. Diagrama general para la preparación y determinación de fenoles totales.....	40
Figura 18. Absorbancias esperadas para el cálculo de fenoles totales por fórmula farmacopéica.....	42
Figura 19. Procedimiento realizado para llegar a concentración aproximada de ácido gálico buscada.....	43
Figura 20. Cromatoplasmas de los tres extractos orgánicos y los respectivos estándares de referencia.....	49
Figura 21. Gráfico de la curva de calibración ajustada de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales y representación de la reacción colorimétrica de la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu en una placa de ELISA	51
Figura 22. Representación de la reacción colorimétrica de atrapamiento del radical libre DPPH.....	57
Figura 23. Representación de la cinética de reacción de neutralización del radical libre DPPH de las muestras del extracto metanólico utilizando tres compuestos de referencia	58
Figura 24. Representación de la reacción colorimétrica de neutralización del radical libre ABTS.....	60
Figura 25. Representación de la cinética de reacción de neutralización del catión libre ABTS de las muestras del extracto metanólico utilizando tres compuestos de referencia	60



Figura 26. Representación de la reacción colorimétrica de la capacidad de reducción del Fe^{3+}	62
Figura 27. Curva de calibración de ácido ascórbico (0-1000 mM) para el ensayo de FRAP	62
Figura 28. Curva de calibración de Trolox (0-600 mM) para el ensayo de FRAP. 63	
Figura 29. Representación de la reacción colorimétrica del ensayo de blanqueamiento de β -caroteno.....	64
Figura 30. Cromatograma de la corteza de <i>A. acuminata</i> obtenido con la fibra DVB/CAR/PDMS por CG-EM	69
Figura 31. Cromatograma de la raíz de <i>H. longipes</i> obtenido con la fibra DVB/CAR/PDMS por CG-EM	72
Figura 32. Estabilización del aroxi-radical y del ion fenolato en compuestos fenólicos (grupo catecol)	76



Lista de Tablas

Tabla 1. Clasificación botánica de <i>Alnus acuminata</i> (Schlechtendal) Furlow	7
Tabla 2. Compuestos aislados e identificados del género <i>Alnus</i>	11-12
Tabla 3. Clasificación botánica de <i>Heliopsis longipes</i> (A. Grey) S.F. Blake	13
Tabla 4. Compuestos marcadores utilizados para su identificación por CCF en los diferentes extractos	38
Tabla 5. Concentraciones trabajadas para realizar las curvas de calibración independientes de ácido gálico	41
Tabla 6. Resultados de la medición de absorbancia de la muestra de <i>A. acuminata</i> (1 mg/mL; dilución 1:5).....	52
Tabla 7. Concentración de fenoles totales de <i>A. acuminata</i> expresadas como equivalentes de ácido gálico (1 mg/mL; dilución 1:5).....	52
Tabla 8. Contenido de fenoles totales en la corteza de <i>A. acuminata</i> obtenido a partir de la curva de calibración de ácido gálico	53
Tabla 9. Resultados obtenidos de la medición de absorbancias de las diferentes réplicas de ácido gálico (116.8 mg/mL).....	54
Tabla 10. Resultados obtenidos de la medición de absorbancias de las diferentes réplicas de la solución de extracto metanólico (1 mg/mL) de corteza diluido 1:5..	55
Tabla 11. Contenido de fenoles totales en la corteza de <i>A. acuminata</i> calculado por fórmula farmacopéica	56
Tabla 12. Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para el extracto metanólico en comparación con las referencias utilizadas para el ensayo de neutralización de DPPH	59



Tabla 13. Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para el extracto metanólico en comparación con las referencias utilizadas para el ensayo de neutralización del catión ABTS.....	61
Tabla 14. Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para el extracto metanólico en comparación con las referencias utilizadas para el ensayo de FRAP	63
Tabla 15. Resumen de los parámetros obtenidos de capacidad de lipoperoxidación mediante el ensayo de blanqueamiento de β -caroteno	65
Tabla 16. Compuestos volátiles detectados en la corteza de <i>A. acuminata</i> ...	67-68
Tabla 17. Compuestos volátiles detectados en la raíz <i>H. longipes</i>	70-71
Tabla 18. Tratamiento experimental realizado para la microextracción en fase sólida de ambas materias vegetales	80
Tabla 19. Resultados de la primera curva de calibración de ácido gálico	94
Tabla 20. Resultados de la segunda curva de calibración de ácido gálico	94
Tabla 21. Resultados de la tercera curva de calibración de ácido gálico	94
Tabla 22 y 23. Estadísticas de la regresión ajustada de la primera curva de calibración	95
Tabla 24. Análisis de varianza de los datos de absorbancia y concentración de ácido gálico conocidas	96
Tabla 25 y 26. Estadísticas de la regresión ajustada de la segunda curva de calibración	96-97
Tabla 27. Análisis de varianza de los datos de absorbancia y concentración de ácido gálico conocidas	97
Tabla 28 y 29. Estadísticas de la regresión ajustada de la tercera curva de calibración	98



Tabla 30. Análisis de varianza de los datos de absorbancia y concentración de ácido gálico conocidas	98
Tabla 31 y 32. Estadísticas de la regresión ajustada de la tercera curva de calibración	99
Tabla 33. Análisis de varianza de los datos de absorbancia y concentración de ácido gálico conocidas	100
Tabla 34 y 35. Estadísticas de la regresión ajustada de la tercera curva de calibración	101-102
Tabla 36. Análisis de varianza de los datos de absorbancia y concentración de Trolox conocidas	102
Tabla 37 y 38. Estadísticas de la regresión ajustada de la tercera curva de calibración	103
Tabla 39. Análisis de varianza de los datos de absorbancia y concentración de Trolox conocidas	104
Tabla 40 y 41. Estadísticas de la regresión ajustada de la curva de calibración de ácido ascórbico ajustada	105
Tabla 42. Análisis de varianza de los datos de absorbancia y concentración de ácido ascórbico conocidas	105
Tabla 43 y 44. Estadísticas de la regresión ajustada de la curva de calibración de Trolox ajustada	106
Tabla 45. Análisis de varianza de los datos de absorbancia y concentración de Trolox conocidas	107



Lista de Gráficos

Gráfico 1 y 2. Representación gráfica de la primera curva de calibración de ácido gálico ajustada (a); gráfico de residuales (b).....	95
Gráfico 3 y 4. Representación gráfica de la segunda curva de calibración de ácido gálico ajustada (a); gráfico de residuales (b).....	96
Gráfico 5 y 6. Representación gráfica de la tercera curva de calibración de ácido gálico ajustada (a); gráfico de residuales (b).....	97
Gráfico 7 y 8. Representación gráfica de la curva de calibración de ácido gálico ajustada (a); gráfico de residuales (b)	99
Gráfico 9 y 10. Representación gráfica de la curva de calibración de Trolox (a); gráfico de residuales (b) para el ensayo de DPPH	101
Gráfico 11 y 12. Representación gráfica de la curva de calibración de Trolox (a); gráfico de residuales (b) para el ensayo del ABTS	103
Gráfico 13 y 14. Representación gráfica de la curva de calibración de ácido ascórbico (a); gráfico de residuales (b) para el ensayo de FRAP	104
Gráfico 15 y 16. Representación gráfica de la curva de calibración de Trolox (a); gráfico de residuales (b) para el ensayo de FRAP	106



1. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales con aplicaciones curativas se remonta al inicio de la humanidad, cuando el hombre recurría a la naturaleza y de ésta obtenía sus alimentos para cuidar de su salud, aprendiendo y conociendo de aquellas que lo curaban¹. A través del tiempo y de diferentes culturas se fueron adquiriendo conocimientos empíricos sobre las propiedades medicinales de diversas plantas y hierbas, los cuales se transmitieron de forma oral o escrita a posteriores generaciones². Estas son las bases de la Medicina Tradicional moderna, la cual se define por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la suma de todos los conocimientos y prácticas, sean explicables o no, que se utilizan para el diagnóstico, la prevención y eliminación de todo desequilibrio físico, mental o social, basado exclusivamente en la experiencia práctica y en la observación, transmitidos de generación en generación de forma oral o escrita.

En México, el uso de las plantas medicinales forma parte de una alternativa a la que la gente ha recurrido con el fin de enfrentar o mimetizar alguna enfermedad o padecimiento. Nuestro país, al gozar de una gran biodiversidad (el cual, consta de alrededor de 30,000 especies de plantas de las cuales entre el 10-15% tienen un potencial terapéutico relevante^{3,4,5,6,7}), ha permitido realizar la búsqueda continua de productos naturales para atender los problemas prioritarios de salud mediante tratamientos médicos accesibles que permitan llevar una vida saludable⁸. Es por ello que en la actualidad se tiene gran interés en investigar cada vez más a fondo las propiedades que estos productos naturales brindan.

En general, las plantas medicinales tienen un efecto terapéutico en el ser humano cuando se emplean de forma apropiada. Por esta razón, a lo largo del

¹ Hernández, M. R. et al. M. (1981), *Plantas medicinales. uso y dosificación de las 184 plantas más usadas en América latina*, pp.7.

² Rojas-Alba, M. (2010), *Herbolario y Medicina Tradicional Mexicana*, México.

³ Martínez, M. (1959), *Las plantas medicinales de México*, pp. 128.

⁴ Argueta, A. et al. (1994), *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*, México.

⁵ Linares, E. et al. (1994), *Selección de plantas Medicinales de México*, México.

⁶ Lozoya, X. (1994), *Two decades of Mexican ethnobotany and research on plant derived In: Ethnobotany and the Search of New Drugs*, pp. 185.

⁷ Aguilar, A. (1999), *Plantas medicinales del Sur de México*, México.

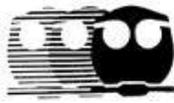
⁸ Osuna-Torres, L. et al. (2005), *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales*, pp. 9.



tiempo se han establecido lineamientos oficiales relacionados con el *control de calidad*, los cuales permiten asegurar la idoneidad de las plantas utilizadas en el país y en el mundo respecto a su identidad y pureza. Es por ello que a lo largo del tiempo se ha recopilado información que hace alusión a la seguridad de los productos en su uso, a los métodos de análisis validados, etc., que satisfagan la necesidad de trabajar con plantas medicinales y sus derivados. Por lo anterior, se optó por la creación de métodos de análisis incluidos por la OMS en los “Métodos de Control de Calidad para Plantas Medicinales”, los cuales, junto con los Métodos de Análisis y los diferentes apartados desplegados en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), en conjunto forman una herramienta analítica importante para el control de calidad.

El interés en la corteza de *Alnus acuminata* se centra en sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, ésta última enfocada al tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas que de acuerdo con la Dra. Margaret Chan, directora general de la OMS, son en la actualidad la principal causa de morbilidad y mortalidad (OMS, 2010).

La importancia del presente trabajo radica en continuar con las investigaciones iniciadas de las dos materias vegetales: corteza de *Alnus acuminata* spp. *arguta*, enfocada a la inclusión de propuestas metodológicas que permitan enriquecer los métodos de análisis descritos en una monografía de la misma en la FHEUM; y de la raíz de *Heliopsis longipes*, de la cual se busca completar información contundente a establecer la composición de los compuestos volátiles, aplicando la técnica de microextracción en fase sólida.



2. ANTECEDENTES

2.1. Control de calidad en plantas medicinales

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de afecciones de la salud mediante las prácticas médicas alopáticas o tradicionales, así como la búsqueda de fuentes potenciales como alternativas naturales, ha tenido un incremento significativo en cuanto a su demanda por la eficaz respuesta en su uso dentro de la población^{9,10,11}. Esto ha generado que la comercialización de productos naturales tenga carencias en cuanto a la regulación de las mismas, al tener un origen sin registro para la fabricación, comercialización, etc., que garantice la eficacia, seguridad y calidad de estos productos¹².

2.2. Monografías como marco de referencia para el control de calidad de las plantas medicinales

Ante la problemática relacionada con aspectos de regulación de productos terapéuticos naturales. La OMS, a partir de 1991, inició la publicación de diversas normas que permitieron facilitar el trabajo de los organismos regulatorios de todo el mundo para lograr el reconocimiento de la medicina herbolaria, de modo que se promueva su uso racional para alcanzar las expectativas deseadas de eficacia y seguridad. Es por ello que se establecieron las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP, por sus siglas en inglés) como criterios de calidad, eficacia y seguridad en todas las materias primas vegetales con fines medicinales¹³. Esta serie de normas hacen alusión a diversos criterios como la inocuidad, eficacia y control de calidad que deben tener las plantas medicinales de amplio uso a nivel internacional. Esta información se incluye en monografías que contienen información general (conceptos, distribución geográfica), así como los análisis químicos y botánicos que permiten establecer los criterios de identidad, pureza y composición. También se incluyen aspectos como: usos tradicionales, farmacología, clínica, toxicología,

⁹ Plotkin, M., (2001), *Global Phytochemistry: the ethnobotanist view*, 56, 117-120.

¹⁰ Kumar, S. et al. (2003), *Herbal Medicine: current status and the future*, 4, 281-288.

¹¹ Phillipson, J. (2011), *Phytochemistry and medicinal plants*, 56, 237-242.

¹² Timothy, F. et al. (2004), *Medicinal plants and herbs of Newfoundland and part 1. Chemical constituents of aerial part of pineapple weed (Matricaria matricaroides)*, 12, 131-135.

¹³ Walter, F. (2005), *The pathophysiology of cute pain*, 23:277-284.



posibles efectos secundarios y la posología de cada droga cruda. Ejemplos de estos documentos son:

- La *Farmacopea Herbolaria Americana* de los Estados Unidos de Norteamérica promueve el uso responsable de medicamentos herbolarios mediante monografías que abarcan aspectos como: seguridad, preparación y almacenaje de las plantas medicinales.
- En México, la *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos* (FHEUM, 2001 y 2013) contiene monografías de plantas y algunas esencias que incluyen aspectos como: características de identidad, pureza y composición de las drogas crudas, así como un apartado con Métodos Generales de Análisis que describe los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir las plantas y los derivados de ellas que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios.

En este contexto, al tener en existencia sólo dos ediciones de la FHEUM, es primordial la realización de investigaciones científicas que complementen y enriquezcan las monografías científicas de las plantas medicinales descritas y anexar aquellas de reciente estudio para establecer lineamientos de regulación que proporcionen información más completa y actualizada en cuanto a estudios químicos (identidad, eficacia, seguridad y pureza), farmacológicos, toxicológicos, etc., para así validar sus propiedades medicinales.

2.3. Parámetros de calidad de las drogas vegetales

La evaluación de la calidad en fitofármacos es un requisito básico en los medicamentos alopáticos, ya que de ello depende la reproducibilidad de los diferentes parámetros de seguridad y eficacia^{14,15,16,17}. Sin embargo, en

¹⁴Bauer, R. et al. (1996), *Quality assessment of herbal preparations as precondition of pharmacological and clinical studies*, 2, 193-198.

¹⁵ Bauer, R. (1998), *Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drugs standards be achieve?*, 32, 101-110.

¹⁶ Busse, W. (2000), *The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicine products*, 34, 15-23.



comparación con los medicamentos convencionales, éstos tienen un contenido más complejo, lo que implica en ocasiones una mayor dificultad para caracterizar a los compuestos activos. Por ello es importante el uso de métodos analíticos adecuados como la Cromatografía de Gases (CG), para así estudiar selectivamente a los constituyentes presentes y obtener los parámetros dentro del control de calidad adecuado¹⁸.

2.3.1. Ensayos de identidad

Estas pruebas permiten detectar posibles falsificaciones mediante el reconocimiento botánico o a través de pruebas fisicoquímicas que, mediante ensayos cualitativos, permitan establecer la identidad de la droga. Para esto, es indispensable examinar sus características organolépticas (olor, color, sabor y sensación al tacto), morfológicas (análisis microscópico y macroscópico de tallos, hojas, inflorescencias, flores, frutos, semillas, etc.) e histológicas. La identificación química permite realizar pruebas rápidas sobre los extractos orgánicos para identificar específicamente algún componente característico de la planta o sus principios activos.

2.3.2. Pruebas de composición

Estas pruebas permiten cuantificar la presencia de componentes químicos en plantas, las cuales se logran mediante el *desarrollo y validación de métodos analíticos* que hagan reproducible un experimento. En este contexto, la *validación de un método analítico* es el proceso por el cual se establecen las características analíticas necesarias para evaluar si el método utilizado es adecuado para el fin que se pretenda en términos de linealidad, reproducibilidad, precisión, exactitud, robustez, etc. Las cuantificaciones se realizan en términos de compuestos marcadores o del principio activo.

¹⁷ Franz, G. *et al.* (2001), *Results and methods of work of the European pharmacopoeiae. Proceedings of the International Symposium of Herbal Medicine Products: Quality Evaluation. Contribution of the European Pharmacopoeiae*, 17-25.

¹⁸ Lazarowich, N.J. *et al.* (1998), *Use of fingerprinting and marker compounds for identification and standardization of botanical drugs: strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis to herbal products*, 32, 493-512.



2.3.3. Pruebas de pureza

Estas pruebas se relacionan con la identificación y determinación de materiales ajenos o contaminantes que estén presentes en el material vegetal, ya sea de origen químico, biológico o físico. Puede realizarse una inspección visual, en la cual se detectan defectos en el transporte, almacenaje o recolección de la planta, así como defectos en su desecación, la presencia de adulteraciones, insectos, etc., seguido de la realización de diversos ensayos fisicoquímicos cuantitativos aplicables a todas las especies vegetales, como porcentaje de humedad, residuos de ignición, presencia de metales pesados, residuos de pesticidas, contaminación microbiológica, contaminación radioactiva, etc.

2.4. Generalidades sobre *Alnus acuminata*

2.4.1. Familia *Betulaceae*

Es una familia de árboles o arbustos dicotiledóneos caducifolios y monoicos repartidos en seis géneros que presentan hojas simples y alternadas. Sus flores masculinas presentan perianto simple, en grupos de tres en la axila de una bráctea, se disponen en amentos colgantes con forma de péndulos; y las flores femeninas no presentan perianto, y se disponen en amentos derechos en grupos de dos a tres en la axila de una bráctea. Presenta frutos secos, semillas, hojas y en la corteza abundan gran cantidad de compuestos en su mayoría taninos y algunos glucósidos. Se encuentran comúnmente en regiones templadas de los trópicos y zonas de montaña del hemisferio norte¹⁹.

Ésta familia se conforma de alrededor de 70 a 157 especies divididas en seis géneros: *Alnus*, *Betula* (37 especies), *Carpinus*, *Corylus*, *Ostrya* y *Ostryopsis*.

¹⁹ Fontquer (1962), *Plantas medicinales*, 97.



2.4.2. Género *Alnus*

Este género está constituido por las especies: *Alnus hirsuta* variedad *sibirica*, *Alnus rubra*, *A. glutinosa*, *A. incana*, *A. oregana*, *A. acuminata* ssp. *arguta*, *A. cordata*, *A. glutinosa*, *A. trabeculosa*²⁰, *A. nepalensis*²¹, *A. japonica*²² entre otras.

2.4.3. Generalidades de *Alnus acuminata* spp. *arguta*

2.4.3.1. Aspectos botánicos

La clasificación botánica se obtuvo de la biblioteca *Integrated Taxonomic Information System*²³.

Tabla 1. Clasificación botánica de *Alnus acuminata* (Schlechtendal) Furlow

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

Su nombre científico es *Alnus acuminata* spp. *arguta* (Schlechtendal) Furlow, como subespecie de la familia *Betulaceae*. Es un árbol de corteza lisa, delgada y poco arrugada, de color claro a gris oscuro que alcanza alturas hasta de 15 a 35 m. El tronco presenta forma cilíndrica a ovalada con ramificaciones alternas, sus hojas son ovaladas, de punta aguda, tiene semillas ovaladas y con alas, y presenta brotes basales²⁴.

²⁰ Miyamoto, N. et al. (2002), *Differences in spatial anticorrelation between four sub-populations of Alnus trabeculosa* Hand.-Mazz (*Betulaceae*), 89: 273-279.

²¹ Yadav, D., et al. (2013), *Antifilarial diarylheptanoids from Alnus nepalensis leaves growing in high altitude areas of Uttarakhand, India*; 20:124– 132.

²² Kim, H.J. et al. (2005). *Nitric oxide and prostaglandin E2 synthesis inhibitory activities of diarylheptanoids from the barks of Alnus japonica Steudel*. 28, 177–179.

²³ <http://www.itis.gov>.

²⁴ Álvarez, V.H. (1956), *Estudio forestal del jaúl Alnus jorullensis (HBK) en Costa Rica*. 96p.



Figura 1. Representación de un árbol característico de *Alnus acuminata* spp. *arguta* (Schlechtendal) Furlow, junto con sus hojas, frutos y brotes basales.

2.4.3.2. Distribución geográfica

Esta corteza es nativa de América Central y de América del Sur, extendiéndose desde el noreste hasta el sur de México (en los estados de Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Edo. de México, Oaxaca, Querétaro y Veracruz) hasta el norte de Argentina, los Andes (Perú) y Bolivia²⁵. Crece en asociación con especies de los géneros *Pinus*, *Quercus* y *Abies*¹⁶. La distribución natural se muestra en la *Figura 2*.

²⁵ CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza), Costa Rica, 1986.



Figura 2. Distribución natural de *Alnus acuminata* spp. *arguta* (Schlechtendal) Furlow en América Central y México²⁶.

2.4.3.3. Nombres comunes

Alnus acuminata spp. *arguta* tiene diferentes denominaciones dependiendo de las localidades de América latina: aile, alder, aliso para México, Argentina, Colombia, Ecuador y Perú²⁷; ramrám y lambdn para Guatemala, Costa Rica y Perú; jaúl en Costa Rica; palo de lama en Guatemala; así como cerezo y chaquiro en Colombia. En los estados de Chiapas, Yucatán y Veracruz en México se les conoce como ilite, aile, abedul o aliso y palo de águila²⁸

2.4.3.4. Subespecies

A. acuminata se encuentra dividida en tres subespecies: *arguta*, *acuminata* y *glabrata*.

²⁶ Martínez, J. (1984), *La flora de Veracruz*. 128-136.

²⁷ Furlow, J.J., (1979), *The systematics of american species of Alnus Betulaceaes*, 81:1-121.

²⁸ *Ib.* 26.



2.4.3.5. Usos medicinales y tradicionales

En el estado de Chiapas es ampliamente utilizada en tratamientos etnomédicos como: antiinflamatorio, para el tratamiento de la escrófula, enfermedades venéreas, sífilis, reumatismo, como expectorante¹² y para infecciones de la piel²⁹.

Artesanalmente se utiliza para fabricar adornos, herramientas, figuras talladas, etc.; en ámbitos agroforestales y ecológicos se utiliza como un buen fijador de nitrógeno en los suelos; a nivel industrial para la fabricación de muebles, decoraciones, etc., mientras que la corteza se utiliza como curtiente, colorante y como materia prima (pulpa) para la elaboración de papel.

2.4.3.6. Antecedentes químicos y farmacológicos

El género *Alnus* posee gran cantidad de compuestos químicos de interés medicinal³⁰. Entre los más relevantes están aquellos de estructura fenólica, como: rododendrina, miricetina, delfinidina y el ácido elágico. De las hojas de algunos géneros de *Alnus* se han aislado flavonoides como la acacetina³¹, saponinas, ácido betúlinico y/o betulina^{14,32}, así como esteroides como: β -sitosterol y dammaranos³³.

En la *Tabla 2* se enlistan algunos de los metabolitos secundarios aislados en las diferentes especies de *Alnus*.

²⁹ *Ib.* 26.

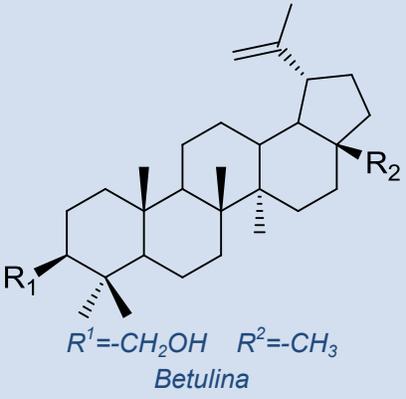
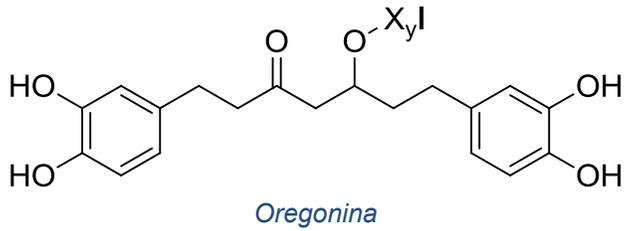
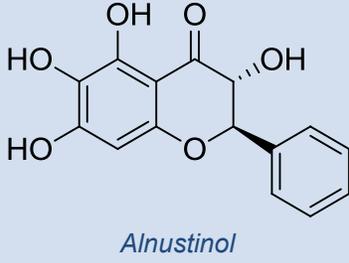
³⁰ Mañes, S. *et al.* (1997), *Effects of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation*, 334: 103-105

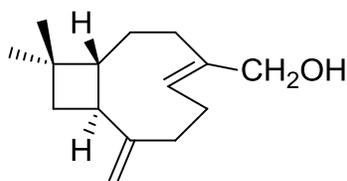
³¹ Evans, T. (1985), *Farmacognosia*, pp. 148.

³² Duke, A.J. (1992), *Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS herbs and other economics plants*, pp. 123-456.

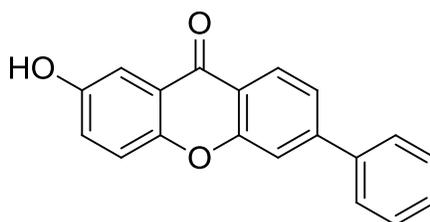
³³ Tyler, E.V. (1979), *Farmacognosia*, pp. 406-415.

**Tabla 2.** Compuestos aislados e identificados del género *Alnus*

Grupo (s)	Ejemplos	Referencia
Triterpenos	 <p>$R^1 = -CH_2OH$ $R^2 = -CH_3$ <i>Betulina</i></p> <p>Otros: <i>β-sitosterol</i>, <i>taraxerona</i>, <i>ácido betulínico</i>, <i>3β-hidroxi-lup-20(29)-eno</i>, <i>3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-oico</i>, etc.</p>	Kuroyanagi <i>et al.</i> , 2005; Jin <i>et al.</i> , 2007; Evans T., 1985; Harbone, 1991; Duke, 1992; Mañes <i>et al.</i> , 1997; Aguilar <i>et al.</i> , 2011.
Diarilheptanoides	 <p><i>Oregonina</i></p> <p>Otros: <i>Henoquina</i>, <i>Hirutanonol</i>, <i>Hirsutenona</i>, <i>Alnúsido</i>, <i>Alnusdiol</i>, <i>Alnusóxido</i>, <i>Alnusonol</i>, <i>Alnusona</i>, <i>Platipilósida</i>, etc.</p>	Kuroyanagi <i>et al.</i> , 2005; Jin <i>et al.</i> , 2007; Min-Won <i>t al.</i> , 2000; Hanawa <i>et al.</i> , 1997; Chen <i>et al.</i> , 2000; Matsuda <i>et al.</i> , 1998; Duke, 1992.
Flavonoides	 <p><i>Alnustinol</i></p> <p>Otros: <i>Afzelina</i>, <i>Quercetina</i>, <i>Isohiperósido</i>, <i>Hinoquinol</i>, <i>Acacetina</i>, <i>Liningenina</i>, <i>4-metil éter apigenina</i>, etc.</p>	Kuroyanagi <i>et al.</i> , 2005; Jin <i>et al.</i> , 2007; Duke, 1992; Harbone, 1991; Evans, 1985; Keinänen <i>et al.</i> , 1998.

**Sesquiterpenos***β*-betulenolTori *et al.*, 1995.Otros:
α-betulenol, etc.**Fenantrenos**

2,3,4-trimetoxifenantreno

Tori *et al.*, 1995.**Fenilxantonas**

Glutanxantona

Peres *et al.*, 2000

Algunos de estos compuestos presentan una actividad antioxidante³⁴ y antiinflamatoria importante, inhibiendo enzimas como la COX-2³⁵, inhibiendo la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y/o la síntesis de óxido nítrico (NO). En el caso particular de *A. acuminata* spp. *arguta*, se encontró actividad inhibitoria de la transcriptasa reversa del VIH-1, actividad en procesos abortivos y antiinflamatoria (δ -aromina y 4',7-dimetoxi-apigenina). Los diarilheptanoides también presentan actividad farmacológica de gran relevancia, al

³⁴ Kuroyanagi, M. *et al.* (2005), *New Diarylheptanoids from Alnus japonica and their Antioxidative Activity*, 53:1519-1523.

³⁵ Min-Won, L. *et al.* (2000), *Inhibition of Cyclooxygenase-2. Expression by Diarylheptanoid from the Bark of Alnus hirsute var. sibirica*, 23:517-518.



relacionarse con actividades: estrogénicas, leishmanicidas, relacionadas a la melanogénesis, entre otras; así como brindar efectos hepato y neuroprotectores³⁶.

2.5. Generalidades sobre *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake

2.5.1. Familia *Asteraceae*

Esta familia consta de más de 23,000 especies de la familia de las angiospermas con mayor riqueza y diversidad biológica³⁷. En general presentan flores que se disponen en una inflorescencia compuesta, la cual está rodeada de una o más filas de brácteas. Las *compuestas* hacen alusión a un tipo particular de inflorescencias que son características de la familia, las cuales se hallan en pocas familias de las angiospermas.

2.5.2. Género *Heliopsis*

La clasificación de éste género ha sido indefinida, ya que hay escasas interpretaciones respecto a su taxa. Por esta razón, los estudios se han basado mayoritariamente en características morfológicas.

2.5.2.1. Aspectos botánicos

La clasificación botánica se obtuvo de la biblioteca *Integrated Taxonomic Information System*³⁸.

Tabla 3. Clasificación botánica de *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	Thacheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Heliopsis</i>
Especie	<i>Heliopsis longipes</i> (A. gray) S.F. Blake

Las especies de éste género son plantas herbáceas perennes o anuales, con hojas compuestas o alternas, subenteras o dentadas, con cabezuelas terminales o

³⁶ Haining, L., et al. (2011), *Naturally occurring diarylheptanoids – A supplementary version*, 6:4, 321-333

³⁷ CONABIO (2008).

³⁸ *Ib.* 23.



axilares, brácteas de tamaño subigual, flores liguladas fértiles, entre otras características³⁹. El género está representado por 14 especies (dependiendo del criterio de diferentes autores): *H. filifolia*, *H. longipes*, *H. sinaloensis*, *H. annua*, *H. anomala*, *H. novogaliciana*, *H. parviceps*, *H. procumbens*, *H. bupthalmoides*, *H. parviflora*, *H. decumbens*, *H. gracilis*, *H. helianthoides*, *H. lanceolata*, de las cuales *H. filifolia*, *H. sinaloensis*, *H. annua*, *H. anómala* y *H. parviceps* son especies endémicas de México⁴⁰.



(a)

(b)

Figura 3. Representación de la planta *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake (a) junto con la raíz (b).

2.5.2.2. Distribución geográfica

Los miembros de esta familia se distribuyen desde las regiones polares hasta los trópicos, abarcando gran variedad de climas extremos, desde regiones áridas (desiertos secos), pantanos, selvas y regiones montañosas⁴¹. En México se distribuye a lo largo de la Sierra Gorda, en los estados de San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro.

³⁹ Rzedowski, J. et al. (2001), *Flora fanerogámica del Valle de México*; pp. 622-624.

⁴⁰ García-Chávez, A. et al. (2004), *El género Heliopsis (Heliantheae: Asteraceae) en México y las alcmidas presentes en sus raíces*, 69:115-131.

⁴¹ *Ib.* 38



2.5.2.3. Nombres comunes

Los diversos nombres que se le atribuyen a esta raíz son: chilcuague o chilcuán⁴², chilmecatl⁴³, ichcha⁴⁴, chilicauau o chicuau⁴⁵, pelitre o peritre⁴⁶, raíz azteca o raíz de oro⁴⁷ y falso girasol⁴⁸.

2.5.2.4. Usos medicinales y tradicionales

En la medicina tradicional se utiliza como analgésico⁴⁹, anestésico local y como antibiótico⁵⁰ para diversas infecciones respiratorias y digestivas. También presenta actividades antivirales, para tratamientos bucales, como fungicida, con actividad molusquicida, etc.

Tradicionalmente también se utiliza para condimentar platillos⁵¹, como agente paralizante de algunos insectos (insecticida).

2.5.2.5. Antecedentes químicos y farmacológicos

El género *Heliopsis* presenta una gran cantidad de alcanidas alifáticas y acetilénicas, entre las cuales la más importante es la afinina, que tiene acción anestésica local⁵², provoca estímulos organolépticos, y actividades insecticidas y bactericidas.

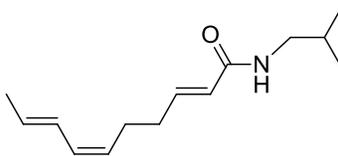


Figura 4. Estructura química de la afinina, como uno de los metabolitos secundarios mayoritarios en la raíz de *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake

⁴² Molina-Torres, J. et al. (2001), *Alcanidas en plantas: distribución e importancia*, **20**:377-387.

⁴³ Martínez, M. (2005), *Las plantas medicinales de México*, pp. 113-115.

⁴⁴ *Ib.* 40.

⁴⁵ *Ib.* 40.

⁴⁶ *Ib.* 43.

⁴⁷ *Ib.* 40.

⁴⁸ *Ib.* 40.

⁴⁹ Ríos, L.G. (2007), *Control de calidad de una droga de origen vegetal: Iostephane heterophylla (Cav.) Hemsj.* Facultad de Química, UNAM.

⁵⁰ Molina, J. et al. (2004), *Fungistatic and bacteriostatic activities of alcanides from Heliopsis longipes roots: affin and reduced amides*, **52**: 4700-4704.

⁵¹ *Ib.* 40.

⁵² *Ib.* 49



2.6. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias de estructura particular que permite retardar, prevenir o remover el daño oxidativo generado por determinada molécula⁵³, a través de la deslocalización de electrones a los radicales libres hasta estabilizarlos y así combatir la degeneración y muerte celular. Esto puede realizarse tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos⁵⁴.

2.6.1. Clasificación

Los antioxidantes se clasifican dependiendo de su origen, el sitio donde ejercen su acción y la fuente de la que provienen⁵⁵.

Por su origen pueden ser:

- *Endógenos*. Se constituyen por mecanismos de defensa propios del organismo. Ejemplo: SOD, GSP, catalasa, tocoferol, ubiquinona, carotenoides y ácido ascórbico.
- *Exógenos*. Son aquellos que se obtienen por medio de la dieta, como: vitamina E, vitamina C, diversos flavonoides, etc.

Por su sitio de acción:

- Intracelular (superóxido, catalasa, peroxidasa, glutatión peroxidasa, proteínas que ligan metales, etc.).
- Membrana (vitamina E, β -caroteno, ubiquinol-10).
- Extracelulares (ceruloplasmina, transferinas, lactoferinas, albúminas, haptoglobinas, vitamina C, ácido úrico, vitamina E).

Por su fuente⁵⁶:

- Naturales. Se obtienen principalmente de plantas y vegetales (eugenol, ácido caféico, apigenina, etc.).

⁵³ Prochazkova, D. et al. (2011), *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids*, 82:513–523.

⁵⁴ Venereo-Gutierrez, J. R. (2002), *Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes*, 31(2):126-33.

⁵⁵ Iglesias-Neira, J. (2009), *Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca*, Compostela.

⁵⁶ *Ib.* 54.



- Sintéticos. Se sintetizan como: *ter*-butilhidroxitolueno (BHT), *ter*-butilhidroxianisol (BHA) y *ter*-butilhidroxiquinona (TBHQ).

2.6.2. Compuestos fenólicos

Tienen potentes actividades antioxidantes y atrapadoras de radicales libres *in vivo*. Las plantas poseen una mezcla compleja de compuestos polifenólicos⁵⁷, los cuales se encuentran en gran cantidad de frutos, hortalizas, bebidas (té, café, cerveza, etc.), cereales, entre otros. La cantidad recomendada que debe ingerirse de antioxidantes es de 800 mg/día.

La biosíntesis de los compuestos fenólicos como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar gracias a dos rutas biosintéticas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los policétidos⁵⁸. En general estos compuestos poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Su clasificación depende del número de anillos fenólicos que contiene y los elementos estructurales que unen a los anillos⁵⁹.

Compuestos fenólicos simples. Se componen de fenoles que tienen un patrón de sustitución del anillo bencénico por grupos –OH en las posiciones 1,2-, 1,3- y 1,4- o trisustituido en 1,3,5-. Ejemplo de ello es el 1,3-dihidroxibenceno.

Ácidos fenólicos y aldehídos. Se caracterizan por la presencia del grupo carboxilo sustituido en un fenol. Un ejemplo es el ácido gálico.

Acetofenonas y ácidos fenilacéticos. Corresponde a compuestos C₆-C₂ que son poco frecuentes en la naturaleza. Ejemplo: 2-hidroxiacetofenona.

Ácidos cinámicos. Este grupo comparte el esqueleto carbonado C₆-C₃. Ejemplo: ácido cinámico y ácido siquímico.

⁵⁷ *Ib.* 53.

⁵⁸ Quinones, M. *et al.* (2012), *Los polifenoles. compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular*, 27(1):76-89.

⁵⁹ Manach, C. *et al.* (2004), *Polyphenols: food sources and bioavailability*, 79:727-47.



Cumarinas. Estos compuestos poseen una estructura de 2H-1-benzopiran-2-ona (cumarina), con un sustituyente –OH en la posición 7, de forma libre o funcionalizada. Son de gran relevancia, ya que permite la resistencia a enfermedades (como la peste), así como la radiación UV. Ejemplo: umbeliferona

Flavonoides. Son estructuras que presentan un anillo bencénico (A) proveniente de los policétidos, fusionado a un anillo heterocíclico C, el cual se encuentra unido a un tercer anillo B (derivado de la ruta del ácido siquímico, cuyo precursor es la fenilalanina). Se encuentran en gran variedad de frutas, verduras, cereales, semillas y productos como la cerveza, café y té⁶⁰. Se les atribuye gran diversidad de efectos terapéuticos, al poseer actividad cardiotónica, hepatoprotectora, antiinflamatoria, antineoplásica, antimicrobial, etc⁶¹.

2.6.3. Relación estructura química – actividad antioxidante

La actividad antioxidante de diversos compuestos depende de los grupos funcionales que posea y de una gran variedad de patrones de sustitución, así como la posición de los mismos. Estos parámetros estructurales son⁶²:

Grupos hidroxilo en la molécula y dobles enlaces conjugados a un grupo oxo. Permiten una actividad neutralizadora de radicales libres. La actividad antioxidante generalmente se incrementa conforme mayor sea el número de hidroxilos en su estructura. Ejemplo de ello la presenta el grupo *catecol* (con grupos –OH en posición 3' y 4' en el anillo B, y en posiciones 2-3 conjugadas a un grupo oxo en el anillo C), en el cual, estos grupos incrementan la actividad antioxidante considerablemente. La posición del doble enlace conjugado permite la deslocalización electrónica del anillo B.

⁶⁰ *Ib.* 55.

⁶¹ *Ib.* 55.

⁶² *Ib.* 55.

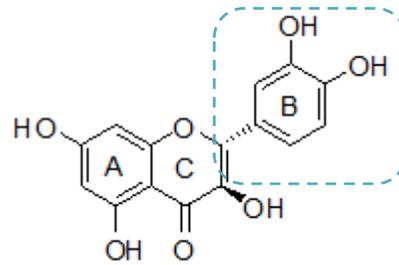


Figura 5. Estructura química de un flavonoide con el grupo catecol

Esterificación con grupos glucosídicos y no glucosídicos. En el caso de los flavonoides, es crucial la posición y estructura del azúcar sustituyente. Esto permite la esterificación de ácidos orgánicos en el hidroxilo (posición 3), por ejemplo en los galatos.

Grado de polimerización. Los compuestos fenólicos, al poseer estructuras complejas, no llevan a establecer correlaciones entre la estructura y la actividad. Sin embargo, en el caso de la polimerización de compuestos como las procianidinas, los dímeros y trímeros son más eficaces para neutralizar (por ejemplo) el radical superóxido⁶³.

2.7. Ensayos para la determinación de compuestos fenólicos

Existen diversos ensayos que permiten determinar y cuantificar los fenoles totales en diversas fuentes naturales. Los más utilizados son los ensayos de detección y cuantificación con vainillina y con el reactivo de Folin-Ciocalteu⁶⁴.

2.7.1. Ensayo de Folin-Ciocalteu

Este método se basa en la capacidad que presentan diversos agentes oxidantes para reaccionar con compuestos fenólicos. El reactivo de Folin-Ciocalteu está formado de sales de molibdato y tungstato sódicos, las cuales reaccionan con cualquier fenol para formar el complejo fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia electrónica reduce estos complejos en óxidos cromógenos de

⁶³ *Ib.* 55.

⁶⁴ Gutiérrez-Avella, D. M. (2008), *Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal*, Querétaro.



coloración azul (en medio alcalino), siendo proporcional al número de grupos hidroxilos de la molécula⁶⁵. Una desventaja de este ensayo es que es altamente inespecífico.



Figura 6. Reacción de Folin-Ciocalteu

2.7.2. Ensayo de la vainillina

Este método es útil para detectar y cuantificar taninos condensados. Al ser una reacción sensible y específica, debe controlarse la temperatura de reacción y debe realizarse en ausencia de luz⁶⁶. Se basa en la condensación de la vainillina con protocianinas en condiciones ácidas. Una vez que se protona la vainillina, ésta reacciona por ejemplo con el anillo de los flavonoides en las posiciones 6 u 8. El producto resultante se deshidrata, y da lugar a una coloración rosa a rojo cereza intenso.

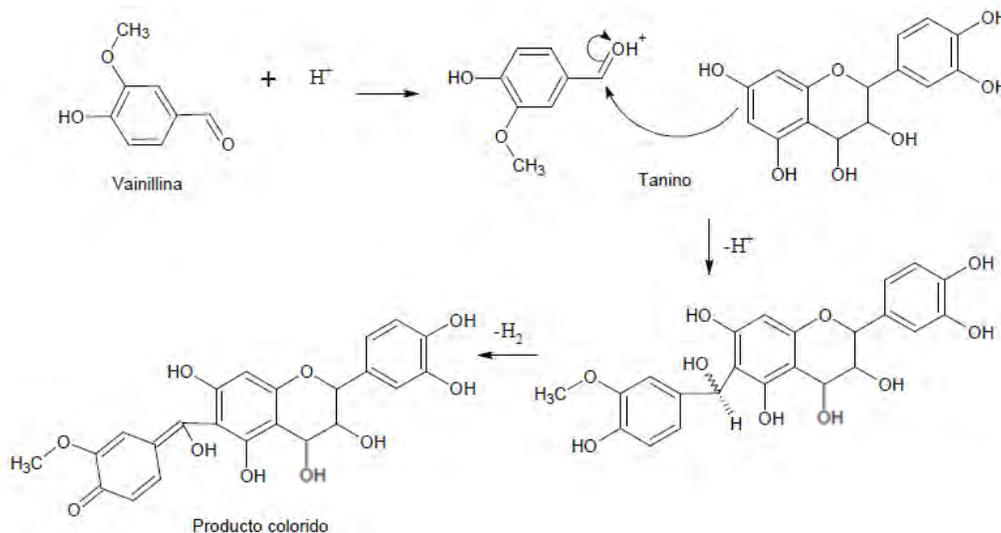


Figura 7. Reacción para la identificación de flavonoides por medio de la vainillina sulfúrica, reproducido y modificado de la literatura⁶⁷

⁶⁵ *Ib.* 64.

⁶⁶ Sarka, K.S. *et al.* (1976), *Specificity of the vanillin test for flavanols*, 24(2):317-320.

⁶⁷ Martínez-Vázquez, M., *et al.* (2004), *Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K.*, 66:79-82.



2.8. Medición de la capacidad antioxidante

Los mecanismos de capacidad antioxidante sobre las ERO's han sido ampliamente documentados en la literatura científica. Dos tipos de pruebas son las más relevantes: a través de *métodos químicos* que involucran la utilización de instrumentos analíticos (como el espectrofotómetro, CG, CLAE, etc.); y mediante el uso de métodos que implican *ensayos biológicos* (como ELISA)⁶⁸.

2.8.1. Ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

El DPPH es un radical orgánico estable de nitrógeno. El ensayo se basa en la estabilización de este radical en la muestra al someterse a la acción de un antioxidante, el cual actúa como donador de protones. Esta estabilización se determina mediante la identificación del compuesto por espectrofotometría UV-VIS, Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y por Resonancia de Espín Electrónico (ESR)⁶⁹

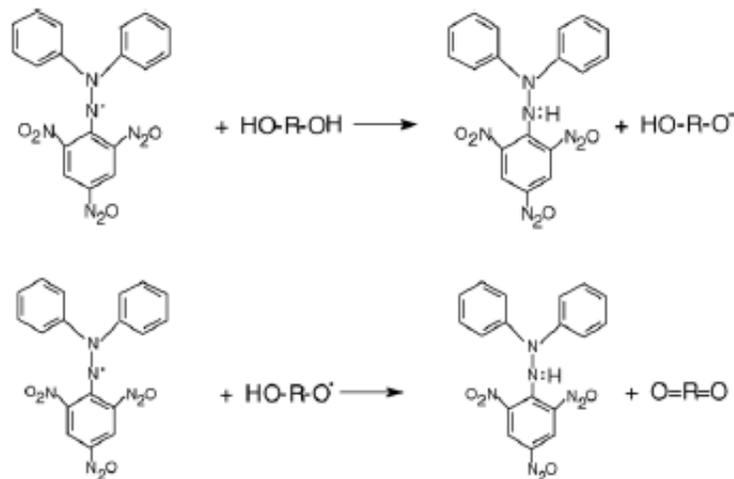


Figura 8. Reacción entre el radical DPPH y una sustancia antioxidante⁷⁰

⁶⁸ Moon, J. et al. (2009), *Antioxidant Assays for Plant and Food Components*, 57 (5):1655-1666.

⁶⁹ *Ib.* 68.

⁷⁰ Dornelles, M.L. et al. (2006), *Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor*, **21**, 1374-1382.



2.8.2. Ensayo del 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS)

Este método se basa en la activación de la metahemoglobina por H_2O_2 en presencia del radical catiónico ABTS, el cual es estable y generado por la oxidación del mismo con $K_2S_2O_8$. Es ampliamente utilizado debido a que se puede realizar tanto en medios acuosos como lipídicos y se determina por el cambio de color azul-verde a $\lambda = 734 \text{ nm}$ ⁷¹.

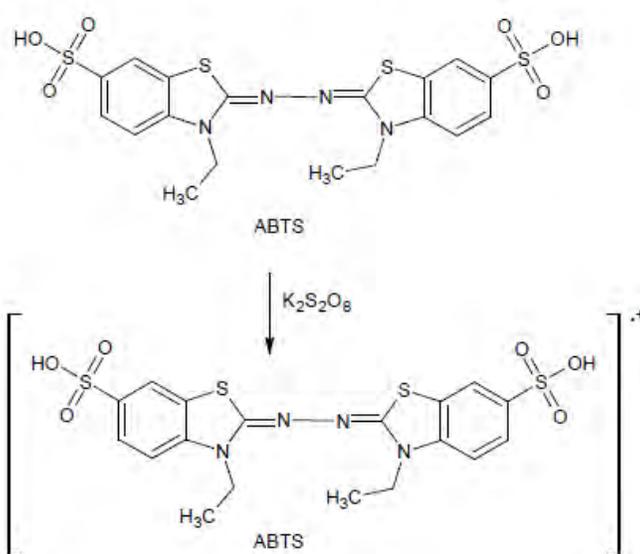


Figura 9. Reacción de formación del radical ABTS con $K_2S_2O_8$ ⁷²

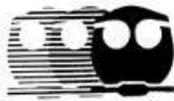
2.8.3. Ensayo de la Capacidad Antioxidante/Reductor de hierro (FRAP)

En este ensayo se produce el complejo Fe^{3+} - 2,4,6-tripiridil-s-triazina (FRAP), el cual se reduce a Fe^{2+} por acción de un antioxidante en condiciones ácidas. La aparición de una coloración azul intensa se monitorea espectrofotométricamente por el cambio de absorción a $\lambda = 593 \text{ nm}$ ⁷³, siendo esta absorción proporcional al poder de reducción total de antioxidantes donadores de electrones presentes en el medio de reacción. Esta reacción no es específica, ya que sí en cualquier reacción

⁷¹ *lb.* 68.

⁷² *lb.* 68.

⁷³ *lb.* 68.



en la que se tengan especies con potencial redox bajo puede favorecer la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} ⁷⁴.

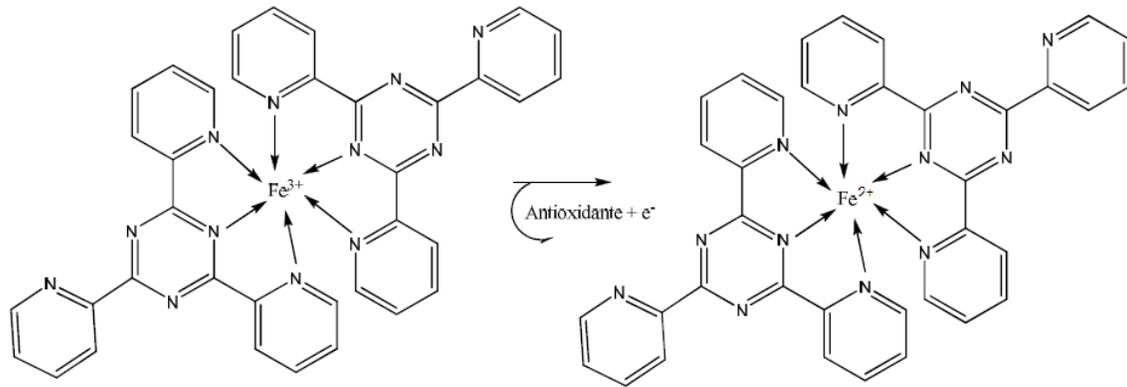


Figura 10. Reacción de formación del complejo (Fe^{2+} – TPTZ) a partir del (Fe^{3+} - TPTZ) ⁷⁵

⁷⁴ Benzie, I.F.F. et al. (1996), *Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration*, **16-17**, 299.

⁷⁵ *Ib.* 68.



2.9. Otros ensayos asociados con el atrapamiento de electrones y radicales libres

2.9.1. Ensayo de oxidación de hierro-naranja de xileno (FOX)

Este ensayo permite la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} utilizando un agente oxidante (naranja de xileno) para formar un complejo Fe^{3+} - xileno de coloración azul-púrpura. Se le da seguimiento espectrofotométricamente a $\lambda = 550 \text{ nm}$ ⁷⁶.

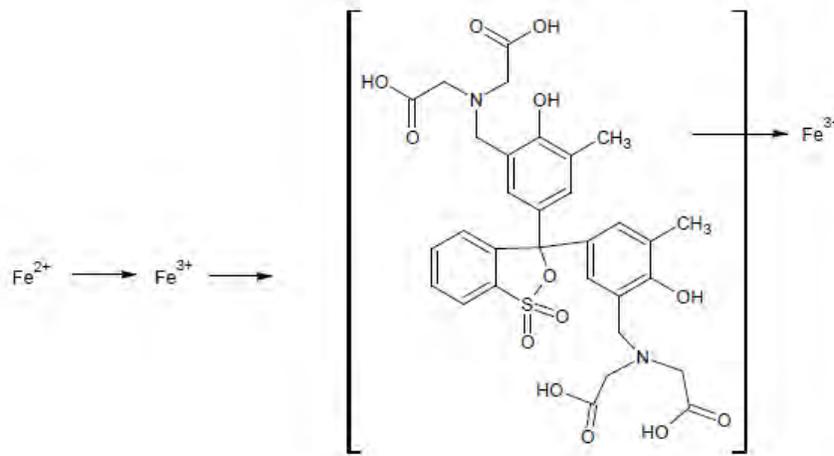


Figura 11. Reacción de formación del complejo (Fe^{3+} – naranja de xileno) a partir del Fe^{2+} oxidado⁷⁷

2.9.2. Ensayo del tiocianato férrico (FTC)

Este ensayo permite la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} utilizando un agente oxidante fuerte (tiocianato férrico) para formar un complejo Fe^{3+} - tiocianato. Se da seguimiento espectrofotométricamente a $\lambda = 500 \text{ nm}$ ⁷⁸.

2.9.3. Ensayo del aldehído / ácido carboxílico

Este ensayo permite evaluar el efecto de diversos antioxidantes en procesos de oxidación lentos o que suceden en periodos de tiempo largo. Se relaciona con la

⁷⁶ *lb.* 68.

⁷⁷ *lb.* 68.

⁷⁸ *lb.* 68.



conversión de un alquilaldehído a ácido carboxílico en presencia de radicales libres⁷⁹.

2.10. Ensayos asociados con la peroxidación de lípidos

La degradación oxidativa de lípidos tiene gran importancia en ámbitos alimenticios, de oxidación térmica, autooxidación y oxidación generada por ERO's. Los mecanismos de lipoperoxidación más conocidos son los de ácidos grasos insaturados como el ácido linoléico, ácido linolénico, ácido araquidónico y otros ácidos grasos ω -3⁸⁰.

2.10.1. Ensayo de blanqueamiento del β -caroteno

Permite la formación de un radical peroxilo estable al reaccionar el ácido linoléico con el β -caroteno, reduciéndose la cantidad de β -caroteno libre en el medio de reacción y monitoreando su desaparición a $\lambda = 470 \text{ nm}$ ⁸¹.

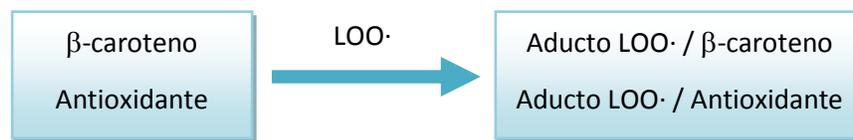


Figura 12. Reacción de formación de los aductos de β -caroteno y un antioxidante con el radical peroxilo⁸²

2.11. Otros ensayos antioxidantes relacionados a la peroxidación de lípidos

2.11.1. Ensayo del ácido tiobarbitúrico

El ácido tiobarbitúrico reacciona con diversos compuestos con grupos carbonilo generados de un proceso de lipoperoxidación para dar lugar al aducto malonaldehído (MA)-ácido tiobarbitúrico. Se monitorea la reacción por espectrofotometría a $\lambda = 532 \text{ nm}$. También puede utilizarse la técnica de

⁷⁹ *lb.* 68.

⁸⁰ *lb.* 68.

⁸¹ *lb.* 68.

⁸² *lb.* 68.



Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) para determinar la cantidad de MA formado, así como el análisis por Cromatografía de Gases (CG) acoplado a un detector de fósforo-nitrógeno (NPD)⁸³.

2.11.2. Ensayo del dieno conjugado

Se puede monitorear espectrofotométricamente la formación de dienos conjugados a partir de un ácido graso poli-insaturado espectrofotométricamente a $\lambda = 234 \text{ nm}$ ⁸⁴.

⁸³ *lb.* 68.

⁸⁴ *lb.* 68.



2.12. Microextracción en fase sólida (SPME)

Es una técnica basada en la extracción de analitos de una matriz (muestra) mediante la utilización de una fase sólida de sílice fundida recubierta de un adsorbente polimérico, seguida de la desorción de analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico⁸⁵. Esta fase sólida se encuentra incorporada en una jeringa que permite una buena manipulación y cuidado de la misma. Es una técnica selectiva, sencilla, que requiere pequeños volúmenes de muestra, es de fácil transporte, no requiere del uso de disolventes orgánicos y es adecuada para ser utilizada en muestras gaseosas, líquidas y sólidas.

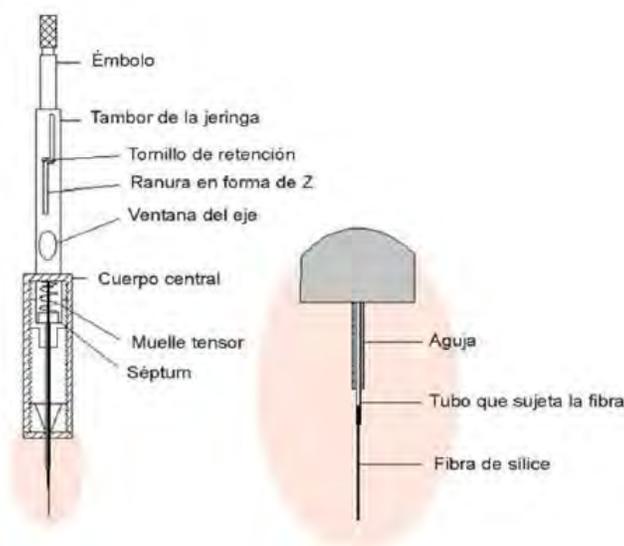


Figura 13. Representación del dispositivo comercial de SPME⁸⁶

La técnica de microextracción en fase sólida (SPME), permite realizar el análisis de los compuestos volátiles presentes en diversas plantas medicinales, mediante la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas^{87,88,89}.

⁸⁵ Wernerowska, G. et al. (2008), *Application of Headspace Solid-Phase Microextraction for Determination of Chloro-Organic Compounds in Sewage Samples*. 18: 543-550.

⁸⁶ Martí, M.P. et al. (2003) *Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography Olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma*. 51: 7861-7865.

⁸⁷ Rubinson, J. et al. (2000), *Análisis instrumental*. pp. 782.

⁸⁸ Harris, D.C. (2008), *Análisis químico cuantitativo*, pp. 517-518, 528-532.

⁸⁹ *Ib.* 86.

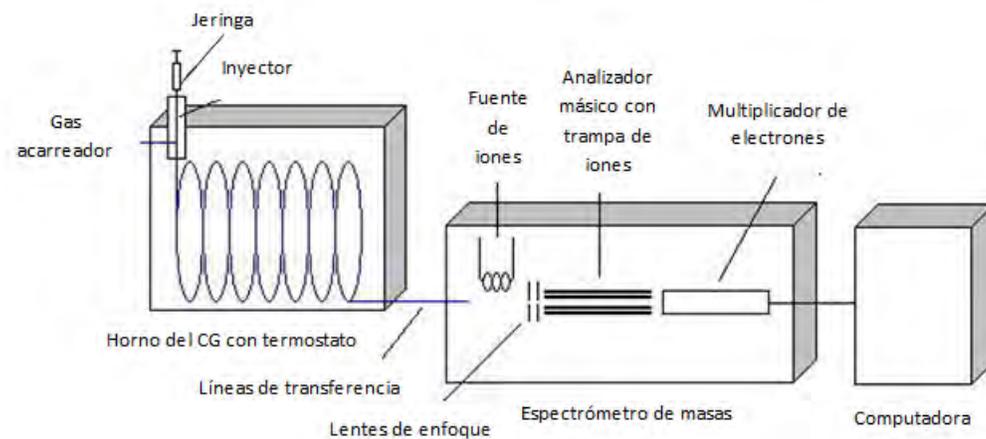


Figura 14. Representación del funcionamiento de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas para la técnica de SPME

2.12.1. Procedimiento para la microextracción en fase sólida

Este se compone de dos etapas:

- a) *Etapa de extracción.* Se coloca la fase sólida con la muestra por analizar dentro de un vial cerrado herméticamente con un septum de silicona-teflón. Se perfora el septum con la aguja y se expone la fibra contenida en ella con la muestra del vial durante determinado tiempo y temperatura para favorecer la migración de analitos volátiles desde la muestra a la fase sólida hasta alcanzar un equilibrio. Una vez terminado el tiempo de extracción, se regresa la fase sólida al interior de la aguja (pasos a, b y c, de la *Figura 15*)

La microextracción realizada es por espacio de cabeza (*headspace*, HS), en la cual se expone la fase sólida a una fase móvil gaseosa (por encima de la muestra) hasta que los analitos se adsorban en la fase sólida. Puede utilizarse en muestras líquidas, gaseosas y sólidas, por ejemplo de sedimentos, alimentos⁹⁰ y muestras biológicas⁹¹.

⁹⁰ Pawliszyn, J. (1997), *Solid phase microextraction, theory and practice*, EUA.

⁹¹ Ulrich, S. et al. (2000), *Solid-phase microextraction with capillary gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus selective method for the assay of antidepressant drug in human plasma*. 696: 217-234.

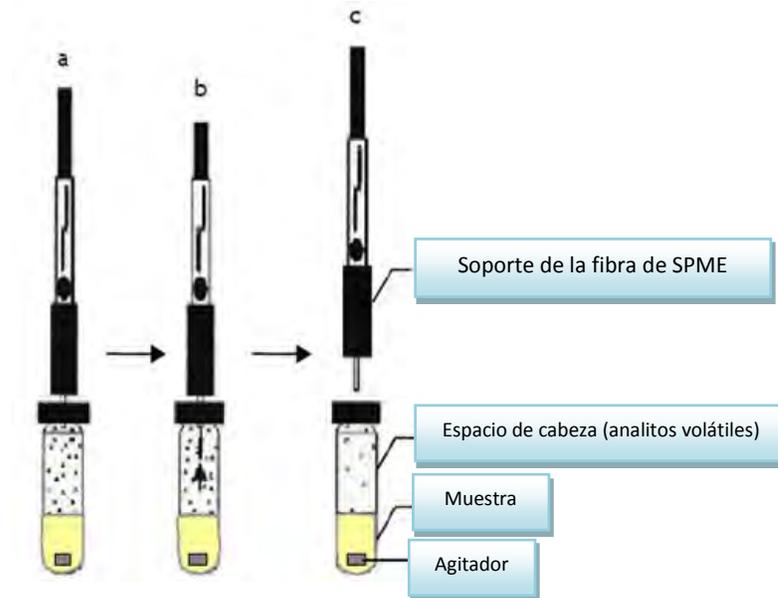


Figura 15. Representación del proceso de absorción de los analitos en el dispositivo de SPME

b) *Etapa de desorción.* Se separan los analitos adsorbidos en la fase sólida por *desorción térmica*, donde al acoplarse el sistema de SPME a un cromatógrafo de gases, la fase sólida se inserta al inyector del mismo (el cual se encuentra a temperaturas elevadas) bajando el émbolo de la jeringa hasta que los compuestos se desabsorban dentro de la columna cromatográfica^{92,93,94,95,96}.

⁹² Constant, M. (1997), *Headspace gas chromatography profiles of fruit flavored malt beverages using solid-phase microextraction*. **55**: 112-118.

⁹³ Song, J. et al. (1998), *Application of solid-phase microextraction and gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for rapid analysis of flavor volatiles in tomato and strawberry fruits*. **46**: 3721-3726.

⁹⁴ Simplicio, A.L. et al. (1999), *Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice*, 833: 35-42.

⁹⁵ Gorecki, T. et al. (1996), *Determination of tetraethyllead and inorganic lead in water by solid phase microextraction/Gas chromatography*. **68**: 3008-3014.

⁹⁶ *Ib.* 95.

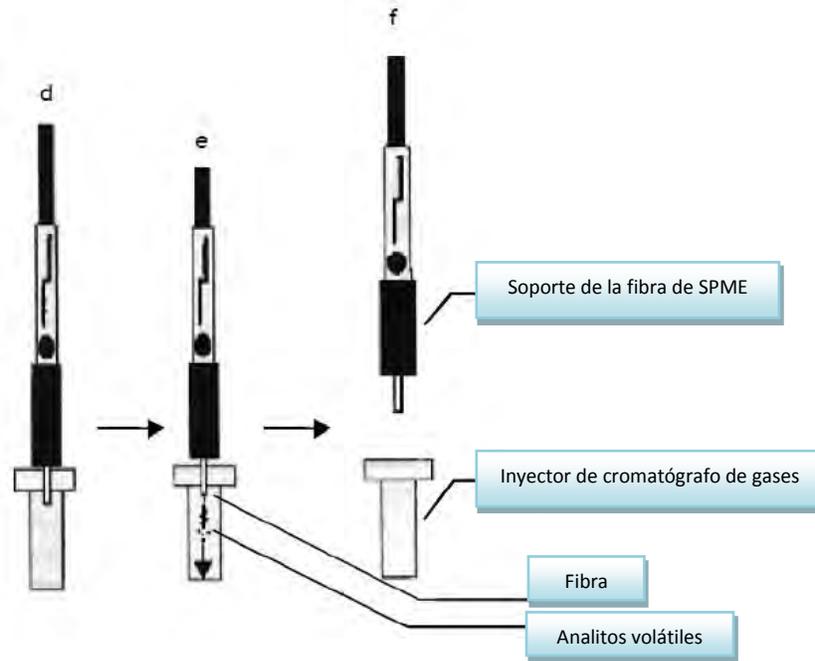


Figura 16. Representación del proceso de desorción de los analitos en el dispositivo de SPME

El cromatógrafo de gases debe de contener los siguientes elementos: puertos de inyección *Split* o *Splitless*, los cuales son adecuados para realizar la desadsorción de analitos de la fase sólida; una válvula de división (*Split valve*) que debe permanecer cerrada durante la desorción, la cual permite que todos los analitos sean introducidos en la columna; e inyectores de inserción (*liner*), cuyo diámetro debe ser similar al de la fase sólida utilizada para que la transferencia sea rápida desde el inyector a la columna.

2.12.2. Variables que afectan el proceso de SPME

Esta técnica se ve afectada por variables experimentales que repercuten sobre el equilibrio del analito extraído, sobre la cantidad de analito que se determina, sobre la desorción de los mismos y la repetitividad y reproducibilidad de los resultados. Modificando esto, puede aumentarse la eficiencia del proceso de extracción



2.12.3. Índice de retención de Kovats

Es un método que permite determinar los tiempos de elución relativa de los diferentes compuestos de una muestra de modo que se realice una comparación con los tiempos de retención de una serie homóloga de hidrocarburos saturados, con el fin de que con ello se puedan identificar los componentes de una muestra. Algebraicamente relaciona el número de carbonos de alcanos pequeños, los alcanos más grandes, con el logaritmo del tiempo de retención. Matemáticamente se representa por la letra “I” o “IK”, y según las expresiones:

Ecuación 1

Para cromatografía isotérmica:

$$I = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{\log(t'_{r(\text{desconocido})}) - \log(t'_{r(n)})}{\log(t'_{r(N)}) - \log(t'_{r(n)})} \right]$$

Ecuación 2

Para cromatografía de temperatura programada:

$$I = \left[\frac{t_{r(\text{desconocido})} - t_{r(n)}}{t_{r(N)} - t_{r(n)}} \right] * (100 \times z) + (100 \times n)$$

Donde:

I: Índice de retención de Kovats

n: Número de átomos de carbono de los alcanos pequeños

N: Número de átomos de carbono de los alcanos grandes

z: Diferencia del número de átomos de carbono entre el alcano pequeño y el grande

t_r': Tiempo de retención (ajustado)



3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos generales

El objetivo general del presente trabajo es la obtención de los parámetros de identidad, composición y de la capacidad antioxidante de la corteza de *Alnus acuminata* spp. *arguta*. Asimismo, se plantea también la determinación del contenido de compuestos volátiles de la raíz de *Heliopsis longipes*. Lo anterior servirá para completar los parámetros que contribuirán al establecimiento de las respectivas monografías tipo OMS y/o farmacopéicas.

3.2. Objetivos específicos

1. Identificar los compuestos marcadores mayoritarios presentes en la corteza de *Alnus acuminata* por medio de cromatografía en capa fina (CCF).
2. Determinar la capacidad antioxidante del extracto de AcOEt de la corteza de *A. acuminata* por medio de la cuantificación de fenoles totales utilizando el método de Folin-Ciocalteu y mediante el empleo de la fórmula farmacopéica.
3. Determinar parámetros de capacidad antioxidante del extracto metanólico de la corteza de *A. acuminata* mediante diversas pruebas reportadas en la literatura: DPPH, ABTS, capacidad de reducción de Fe^{3+} (FRAP) y ensayo de blanqueamiento de β -caroteno.
4. Establecer el contenido de compuestos volátiles presentes en la corteza de *A. acuminata* por el método de microextracción en fase sólida (HS-SPME-CG-EM-TOF). Análisis y determinación de los índices de Kovats con base en la biblioteca NIST.
5. Determinar el contenido de compuestos volátiles presentes de la raíz de *H. longipes* por el método de microextracción en fase sólida (HS-SPME-CG-EM-TOF). Análisis y determinación de los índices de Kovats con base en la biblioteca NIST.



4. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

La medicina herbolaria con el paso del tiempo ha tomado gran relevancia en cuanto a la búsqueda de nuevas alternativas que permitan mejorar la salud de la población. Al existir pocos estudios respecto a los productos naturales en general, las evidencias experimentales relativas a su eficacia, seguridad, inocuidad y calidad de los preparados es escasa, por lo que con el presente trabajo se busca completar investigaciones previas realizadas sobre dos plantas medicinales con el fin de enriquecer diversos aspectos tipo de analítico que permitan la incorporación de estas drogas vegetales a nuevas monografías farmacopéicas dentro de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM).

Alnus acuminata es una planta altamente utilizada en la medicina tradicional mexicana, atribuyéndosele propiedades antiescrofulosas, antiinflamatorias y astringentes e indicada para el tratamiento de diversos padecimientos como dolores musculares y articulares, inflamación de garganta, enfermedades cutáneas y venéreas, entre otras. Por lo anterior, es necesario realizar estudios adicionales a los llevado a cabo con anterioridad, para demostrar la capacidad antioxidante de los extractos, y por otra parte analizar la presencia de compuestos adicionales a los ya encontrados (volátiles), por medio de la técnica de microextracción en fase sólida. Se espera que los resultados obtenidos permitan la inclusión de evidencia experimental dentro de la monografía de la planta medicinal *A. acuminata*, así como su eventual incorporación a la FHEUM.

En el caso de la raíz *Heliopsis longipes*, se pretende también dar continuidad a las investigaciones previas, anexando una lista de los compuestos volátiles que sean identificados por medio de la técnica de microextracción en fase sólida.



5. MATERIALES

5.1. Materia vegetal

La corteza de *Alnus acuminata* spp. *arguta* (Schlecht) Furlow (Betulaceae) se recolectó en el pueblo de Huistan, Chiapas. La identificación de la planta la realizó el Dr. M. Ishiki Ishihara (Ishiki-324), y una muestra de referencia fue depositada en el Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Chiapas. Este material vegetal nos fue donado por el Dr. Andrés Navarrete Castro. El material vegetal se sometió primeramente a un proceso de desecación con calor natural bajo sombra y posteriormente a fragmentación en un molino de cuchillas marca Thomas-Wiley No. 4.

La raíz de *Heliopsis longipes* se recolectó a 3 km de “las presillas” y a 4 km de “mesa de palotes”, en el municipio de San Luis de la Paz, Guanajuato. La identificación de la planta la realizó el M. en C. Ramiro Ríos Gómez, y una muestra de referencia fue depositada en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Zaragoza), con número de voucher 5904. El material vegetal se sometió a un proceso de desecación con calor natural bajo sombra y posteriormente se fragmentó con tijeras, hasta obtener pedazos de 0.5 cm.



5.2. Disolventes y reactivos

Disolventes

- Cloroformo grado R.A.
- Hexano grado R.A.
- Metanol grado R.A.
- Agua desionizada grado I

Reactivos

- Solución al 1% de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ en ácido sulfúrico 2 N.
- Solución de vainillina sulfúrica
- Ácido gálico, Sigma Aldrich. Lote: 037K0069
- Peroxodisulfato de potasio, SigmaUltra 99.0%, Sigma-Aldrich. Lote: 77096PJ.
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, Sigma Aldrich. Lote: STBB0827V.
- 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico, 97%. Lote: STBB6668.
- 2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina, Fluka Analytical. Lote: BCBC7329V.
- 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfúrico), sal de diamonio. Lote: BCBG0034V.
- Cloruro de hierro R.A., Técnica Química. Lote: 16.
- Ácido linoléico, Sigma Aldrich, Lote: 120M1484V
- β -caroteno, Sigma Aldrich. Lote: 079K1729V.
- TWEEN 40, Sigma Aldrich. Lote: MKBD8794V.
- (-)-epicatequina, Sigma Chemistry. Lote: 0001368613.
- Quercetina.
- Helio marca Praxair grado 5.0



5.3. Equipos

La fragmentación del material vegetal se realizó en un molino de cuchillas modelo Thomas-Wiley no. 4.

Para el proceso de extracción se utilizó un sonicador marca Sonicor y CHCl_3 y MeOH como disolventes orgánicos, y para la separación de los sobrenadantes a partir de los extractos obtenidos una centrífuga marca LABNET modelo 2200A.

Para concentrar al vacío los extractos obtenidos se utilizó un rotaevaporador marca Buchi B-480.

El peso de reactivos y materia prima se determinó en una balanza analítica marca OHAUS PA214.

Como revelador cromatográfico se empleó una lámpara de luz UV Spectroline Modelo ENF-240c, a dos diferentes longitudes de onda: 254 y 365 nm.

Para el análisis de microextracción en fase sólida, se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent, modelo 6890N equipado con una columna capilar DB-5, con dimensiones de 10m x 0.18mm x 0.18 μm , acoplado a un espectrómetro de masas marca LECO modelo Pegasus 4D, utilizando el método de ionización electrónica a 70eV, cámara de ionización a 200 °C y línea de transferencia a 250 °C. Se utilizó el programa *ChromaTOF*.

La lectura de las absorbancias se realizó en un espectrómetro lector de placas de ELISA marca BioRad, con el programa Microplate Manager 5.2.



6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Los procedimientos que a continuación se detallan son los descritos por la Organización Mundial de la Salud para el control de calidad de drogas de origen vegetal. Algunos de ellos se encuentran ya incluidos en la nueva edición de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM, 2012) y en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM, 2013).

6.1. Ensayos de identidad

Cromatografía en capa fina (CCF)

Preparación de las soluciones de la muestra

Obtención de extractos orgánicos (hexano, cloroformo y metanol) de *Alnus acuminata*.

La metodología se realizó con base en lo descrito en la literatura científica⁹⁷ con algunas modificaciones. Se pesaron 300 mg de material vegetal molido y se colocaron en dos tubos de ensaye y en un tubo de plástico Falcón de 15 mL. Se adicionaron 2.5 mL de hexano, cloroformo y metanol respectivamente. Se agitaron en un vórtex por 20 minutos a velocidad media para después centrifugarse a 6000 rpm por 15 minutos. Se separó el sobrenadante y éste se filtró por un filtro GHP (0.45 μm) con la ayuda de una jeringa de vidrio, recibiendo el contenido en matraces volumétricos independientes de 5 mL. Esta operación se realizó por triplicado con la misma materia prima. Los extractos fueron evaporados a sequedad.

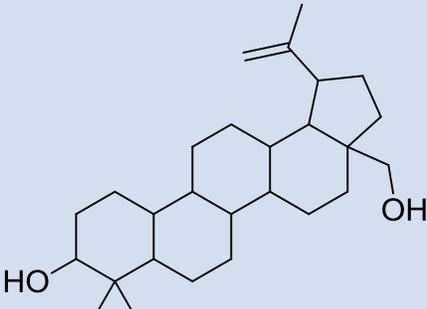
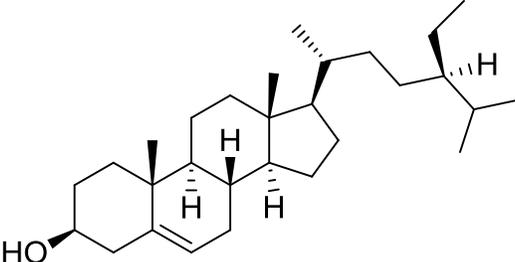
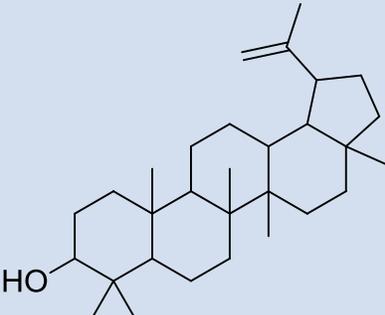
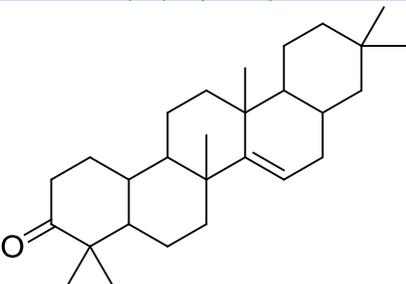
Preparación de las soluciones de referencia

Se utilizaron cuatro estándares como compuestos marcadores de la especie vegetal, a una concentración de 1 mg/mL (*Tabla 4*).

⁹⁷ Navarrete, A. et al. (2009); *Monografía científicas de plantas medicinales de México. Cuachalalate*; pp. 17.



Tabla 4. Compuestos marcadores utilizados para su identificación por CCF en los diferentes extractos

Compuesto	Nombre	Disolvente
E1	 Lup-20(29)-en-3,28-diol	Hexano
E2	 β -sitosterol	Hexano
E3	 20(29)-lupen-3 β -ol	Hexano
E4	 14-taraxeren-3-ona	Hexano



Condiciones cromatográficas

Fase estacionaria: placa de aluminio recubierta de gel de sílice UV₂₅₄ Merck de 10 x 6 cm. Los extractos se colocaron a una distancia de 8 mm por encima de la base de la cromatoplaquea en bandas de 4 mm de ancho con una distancia de separación de 3 mm entre cada una de las bandas y 5.0 mm de distancia de la primer aplicación y los extremos.

Fase móvil: Hex-AcOEt (85:15)

Volumen de cada aplicación: 2.0 µL de la muestra del extracto a analizar y 2.0 µL de cada una de las soluciones de los compuestos de referencia

Reveladores: Solución de sulfato cérico amoniacal y vainillina

Detección: Lámpara UV, a 220 nm

6.2. Determinación del contenido de antioxidantes en *Alnus acuminata*

Obtención del extracto de AcOEt (preparación de la muestra)

Se pesaron 5.080 g de la corteza seca y molida y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, con 100 mL de agua destilada y se sometió a ebullición. La mezcla anterior se dejó en reposo por 30 minutos, se filtró a un embudo de separación y se realizaron particiones con AcOEt (3 X 75 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y llevó a sequedad por presión reducida en un rotaevaporador. El extracto de acetato de etilo obtenido pesó 16.833 mg y se preparó con éste una disolución en MeOH a una concentración de 1.0 mg/mL.

Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu y fórmula farmacopéica (FHEUM, 2013)

Método de Folin-Ciocalteu. a) Extrapolando las absorbancias obtenidas de diferentes concentraciones de muestra en una curva de calibración de ácido gálico, y b) a través de un método farmacopéico (fórmula farmacopéica). De forma general se realizó lo siguiente:



En una placa de 96 pozos (para ensayo de ELISA), se adicionaron los siguientes reactivos en un mismo pozo en el orden que se señala: 160 μL de agua, 20 μL de muestra (solución del extracto) o en su caso solución de ácido gálico (para la preparación de la curva estándar), y 20 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu en MeOH absoluto (1:1), homogenizando dicha mezcla con movimientos circulares suaves. Se dejó reposar la placa por 8 minutos en oscuridad, para posteriormente adicionar de forma rápida y en todos los pozos al mismo tiempo 10 μL de solución de Na_2CO_3 al 20%. Se homogenizó la placa, y se dejó reaccionar en la oscuridad por una hora. Se procedió a leer las absorbancias a 700 nm en un lector de placas de ELISA⁹⁸.

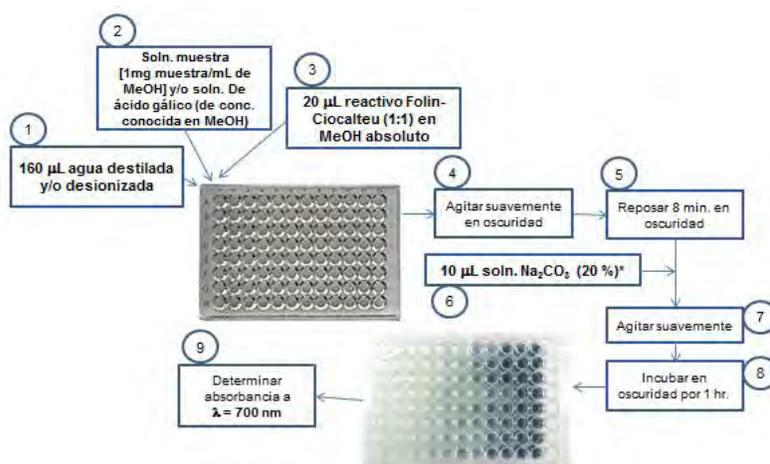


Figura 17. Diagrama general para la preparación y determinación de fenoles totales siguiendo la literatura⁹⁸; (*): la adición del Na_2CO_3 (20%) es determinante para la reacción, por lo que la medición del tiempo debe de ser precisa.

⁹⁸ Singleton, V.L. et al. (1965), *Analisis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*, 299, 152-178.



Construcción de la curva de calibración de ácido gálico (referencia) para la cuantificación de fenoles totales. Análisis estadístico

Se realizaron 3 curvas de calibración independientes con diferentes concentraciones con cuatro réplicas cada una, partiendo de un stock de ácido gálico en metanol destilado a una concentración de 500 mg/mL, como se resume en la *Tabla 5*, llevando a reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu en la oscuridad.

Tabla 5. Concentraciones de las curvas de calibración independientes de ácido gálico.

Curva de calibración	Concentraciones (µg/mL)
I	500, 400, 320, 192, 115.2, 69.1, 41.5, 16.6, 6.6 y 1.3
II	500, 300, 180, 144, 115.2, 92.2, 55.3, 33.2, 13.3, 2.7
III	500, 400, 240, 192, 153.6, 122.9, 73.7, 44.2, 17.7, 3.6

Transcurrida una hora, se leyó la absorbancia en un equipo lector de absorbancias de placa de ELISA a una longitud de onda de $\lambda = 700$ nm. Los resultados obtenidos se muestran en el anexo I.

Cuantificación de fenoles totales en la corteza de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* por medio de fórmula farmacopéica (FHEUM, 2013)

Una alternativa del cálculo para la cuantificación de fenoles totales es por medio de la siguiente *fórmula farmacopéica* la cual permite evaluar rápidamente (a comparación del método de extrapolación en una curva de calibración de ácido gálico) y con menos cálculos el contenido de fenoles totales en la corteza.

Ecuación 3

$$CD \left(\frac{A m}{A_{ref}} \right)$$

Donde:

- C: Cantidad por mL de ácido gálico en la preparación
- D: Factor de dilución de la muestra
- Am: Absorbancia de la muestra
- Aref: Absorbancia de la referencia



Para realizar el cálculo por medio de la fórmula farmacopéica (para obtener mg EAG/g corteza) debe considerarse lo siguiente:

- Concentración de la solución del extracto: 1.0 mg/mL.
- Alícuota inicial de las muestras: 20 μ L.
- Factor de dilución (D) calculado como:

$$D = \frac{(\text{Volumen total de reacción})(\text{dilución de la muestra})}{\text{Alícuota de la muestra}}$$

- Volumen de agua destilada: 160 μ L.
- Volumen de reactivo de Folin-Ciocalteu: 20 μ L.
- Volumen total de reacción por pozo: 210 μ L.

Para la utilización de esta fórmula, fue necesaria la medición espectrofotométrica tanto de la solución del extracto de la muestra (1 mg/mL) como de una referencia de ácido gálico (a concentración conocida), de tal modo que, realizando las diluciones pertinentes, se pudieran correlacionar ambas absorbancias para que se ubiquen cerca del centro de la curva, como se muestra en la *Figura 18*:

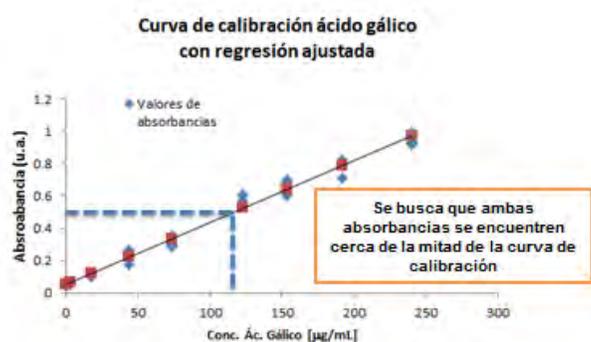


Figura 18. Absorbancias esperadas para el cálculo de fenoles totales por fórmula farmacopéica

Nota: la búsqueda de las diluciones pertinentes permitirá que al dividir el valor de la absorbancia de la muestra entre el valor de la referencia, el resultado sea aproximado a la unidad. Por ello, se realizó el tratamiento que se muestra en la *Figura 19*.



Al conocerse el comportamiento de las diferentes concentraciones de ácido gálico en función de la absorbancia obtenida después de la realización de la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu (*Figura 19*), se observó que la concentración más aproximada al centro de la curva de calibración (50%) es de $120 \mu\text{g/mL}$, por lo cual, experimentalmente se pesó la cantidad de ácido gálico que se muestra en la *Figura 19*, para llegar a esta concentración:

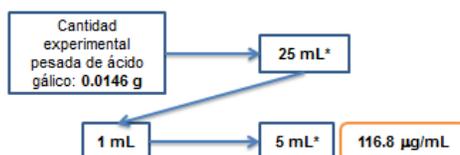


Figura 19. Procedimiento realizado para llegar a concentración aproximada de ácido gálico buscada; *Nota (*)*: los aforos se realizaron con MeOH

Para la solución de la muestra (al igual que la pasada cuantificación, se utilizó a concentración de 1.0 mg/mL), se realizaron diversas diluciones (a modo de prueba) para encontrar aquella que se acercara a la mitad de la curva de calibración. Una vez realizada la reacción de Folin-Ciocalteu, se observó que la dilución que permitió la obtención de absorbancias cercanas al centro de la curva de calibración es de 1:5.



6.3. Ensayos de capacidad antioxidante

Obtención del extracto metanólico

Se colocaron 171.9 g de corteza de *A. acuminata* seca y molida en un matraz Erlenmeyer con 2 L de hexano, y se maceraron por un periodo de 24 horas. Se separó por filtración el disolvente y se dejó secar la corteza por un periodo de dos días al aire libre. Una vez desgrasada, se maceró la corteza en otro matraz Erlenmeyer con 2 L de MeOH, por 48 horas. Se separó el disolvente por filtración y se llevó a sequedad con ayuda del rotaevaporador hasta obtener 26.4 g de extracto sólido.

Ensayos y parámetros

Ensayo de neutralización del radical libre ·DPPH

La metodología de esta prueba se realizó con base en lo descrito en la literatura⁹⁹ con ciertas modificaciones. En una placa de 96 pozos de ELISA se colocaron 100 μ L del extracto metanólico de la corteza a diferentes concentraciones (1.0, 0.5, 0.2, 0.04, 0.01 y 0.002 mg/mL) o soluciones de las referencias a diferentes concentraciones (TROLOX, quercetina y (-)-epicatequina, a 0.002, 0.01, 0.1 y 1.0 mg/mL). A cada una de las muestras anteriores se les adicionó 100 μ L de una solución metanólica de DPPH (0.208 mM). Se incubó la reacción a temperatura ambiente (en ausencia de luz) y se realizó el monitoreo de las absorbancias en un intervalo de 40 minutos, registrando el valor de absorbancia a $\lambda = 515$ nm en un lector de placas de ELISA. Esto se realizó por triplicado, construyendo a su vez una curva de calibración con TROLOX en un intervalo de concentraciones de 0-400 μ M. Se utilizó como blanco MeOH y como control la solución metanólica de DPPH. Los resultados se expresan como equivalentes de TROLOX ($\text{mM}_{\text{TROLOX}}$).

⁹⁹ Cheng, Z. et al. (2006) *High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay*, 54:7429-7436.



Ensayo de neutralización del catión ABTS^{·+}

Este ensayo se realizó con base en la metodología descrita en la literatura¹⁰⁰ con ciertas modificaciones. Se preparó una mezcla de reacción (1:1) que contiene una solución de ABTS (7 mM) y una solución de K₂S₂O₈ (2.45 mM), la cual se conservó durante 16 horas en ausencia de luz, previa a su uso. Esta mezcla se diluyó en MeOH (0.08:20 v/v) para obtener una absorbancia inicial de alrededor de 0.7 u.a. a 734 nm. Se adicionaron en cada pozo de la placa de ELISA 180 µL de la mezcla anterior (radical ABTS), 20 µL del extracto metanólico de la corteza a diferentes concentraciones (1.0, 0.5, 0.2, 0.04, 0.01 y 0.002 mg/mL) y/o las soluciones de las referencias (TROLOX, quercetina y (-)-epicatequina, a 0.002, 0.01, 0.1 y 1.0 mg/mL). Se incubó la reacción a temperatura ambiente (en ausencia de luz) y se realizó el monitoreo de absorbancias durante 20 minutos (en intervalos de 10 segundos) a $\lambda = 734$ nm en un lector de placas de ELISA. Esto se realizó por triplicado, construyendo a su vez una curva de calibración con TROLOX en un intervalo de concentraciones de 0-500 mM. Los resultados se expresan como equivalentes de TROLOX (mM_{TROLOX}).

Ensayo para determinar el poder antioxidante/reductor de Fe³⁺ (FRAP[·])

Esta prueba se realizó de acuerdo a lo descrito en la literatura¹⁰¹ con algunas modificaciones. Se preparó una mezcla de reacción que contiene una solución de TPTZ (10 mM) en HCl (40 mM), a la cual se le adiciona una solución de FeCl₃·6H₂O y buffer de acetatos (300 mM, pH 3.6) todo en la proporción: 2.5:2.5:25 mL. De esta mezcla, se colocó en cada pozo de la placa de ELISA 180 µL del reactivo de FRAP, 20 µL del extracto metanólico de la corteza a diferentes concentraciones (1.0, 0.5, 0.2, 0.04, 0.01 y 0.002 mg/mL) y/o las soluciones de las referencias (TROLOX, quercetina y (-)-epicatequina, a 0.002, 0.01, 0.1 y 1.0 mg/mL). Se incubó la reacción a temperatura ambiente (en ausencia de luz) y se realizó el monitoreo de las absorbancias para determinar el punto final de reacción

¹⁰⁰ Leong, L.P. et al. (2001), *An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapur Markets*, 76, 69–75.

¹⁰¹ Benzie, F.F. et al. (1999), *Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration*, 299, 15-28.



a los 30 minutos a $\lambda = 595$ nm en un lector de placas de ELISA. Esto se realizó por triplicado, construyendo dos curvas de calibración: una con ácido ascórbico en un intervalo de concentraciones de 0-1000 μM , y otra con TROLOX en un intervalo de concentraciones de 0-600 μM . Los resultados se expresan como equivalentes de ácido ascórbico ($\mu\text{M}_{\text{AC. ASCÓRBICO}}$), y equivalentes de TROLOX ($\mu\text{M}_{\text{TROLOX}}$).

Capacidad de neutralizar la lipoperoxidación por medio del ensayo de blanqueamiento de β -caroteno

Esta determinación se realizó con base en lo descrito en la literatura¹⁰² con algunas modificaciones. En un matraz bola de 150 mL se colocaron 0.2 mL de ácido linoléico (0.1 g/mL), 1.0 mL de Tween 40 (0.2 g/mL) y 0.2 mL de una solución de β -caroteno en cloroformo (1.0 mg/mL). La mezcla se diluyó con cloroformo y se mezcló vigorosamente hasta formar una solución homogénea. Esta mezcla se llevó a sequedad con ayuda de un rotaevaporador (la temperatura del agua debe permanecer entre 40 y 50°C) y se le adicionaron 50 mL de agua destilada al residuo y se mezcló vigorosamente hasta formar una emulsión homogénea. De ésta se tomaron alícuotas de 4.8 mL y se colocaron en cinco tubos de ensayo que contenían 0.2 mL de extracto metanólico, cada uno con una concentración de 2, 1, 0.2, 0.02 y 0.004 mg/mL. Posterior a la adición, se mezclaron los componentes suavemente, y se procedió a leer la absorbancia a $\lambda = 470$ nm al tiempo cero y a los 60 minutos, manteniendo los tubos en un baño de agua a 50 °C. Se utilizó como blanco MeOH y como control positivo Trolox (0.5 mg/mL).

¹⁰² Taga, M.S. *et al.* (1984), *Chia seeds as a source of natural lipids antioxidants*, núm. 5, 61, 928-931.



6.4. Determinación de compuestos volátiles por HS-SPME-EM-TOF de la corteza de *A. acuminata* y de la raíz de *H. longipes*

Se utilizó una fase sólida para microextracción (SPME fiber assembly) con las siguientes características: 2 cm-50/30 um DVB/Carboxen/PDMS Stable flex, marca Supelco, lote: P351931 y # cat: 57348-U.

Preparación del CG-EM

Se acondicionó el equipo con las siguientes condiciones:

- Temperatura del inyector: 300 °C.
- Programa de temperatura del horno: 40 °C (por 3 min.), aumentando 20 °C cada minuto hasta los 300 °C (por 5 min.).
- Tipo y tiempo de inyección: Splitless, 1 min.
- Gas acarreador (fase móvil) y flujo: helio (marca Praxair, grado 5.0 de ultra alta pureza) a un flujo de 1 mL/min.
- Temperatura línea de transferencia: 250 °C.
- Tipo de ionización: Ionización por Impacto Electrónico (IE).
- Analizador másico: Tiempo de vuelo (TOF).
- Adquisición espectral: 20 espectros/seg.
- Retraso del encendido del filamento: 0 min.
- Intervalo de masas: 33-550 u.
- Temperatura de la cámara de ionización: 200 °C.
- Compuesto de calibración: PFTBA (Perfluoroterbutilamina).

Con estas condiciones, se colocó la jeringa en el inyector hasta acondicionarla antes de su uso por 2 horas.

Preparación de las muestras por SPME

500 mg de corteza fragmentada (2 mm) de *A. acuminata* fueron colocados en un vial con tapa de silicón, se adicionó NaCl (aproximadamente 100 mg) y con ayuda de un agitador magnético se agitó hasta lograr una agitación constante. Se calentó la mezcla a 45 °C. Posteriormente, una vez que la jeringa del equipo se estabilizó



a las condiciones de temperatura del cromatógrafo, se subió el émbolo, y se colocó en una base que permitía sostener la jeringa sobre el vial con la muestra. Se perforó la tapa del vial (silicón) con la jeringa y se bajó la fibra por medio del émbolo, cuidando que ésta no tocara la solución en agitación contenida en el vial. Se dejó así la fibra por 30 min. En el caso de la raíz de Chilcuague (*Heliopsis longipes*), se colocaron 500 mg en el vial, siguiendo el mismo procedimiento a excepción del tiempo de calentamiento (20 min.). Una vez transcurrido el tiempo, se retiró la fibra con el émbolo cuidadosamente y se colocó la aguja de la jeringa en el inyector y se sometió la fibra hasta que el equipo detectó los compuestos adsorbidos a la misma.

Procesamiento de datos para el análisis por SPME

Una vez realizadas las corridas de ambas muestras, se procedió a realizar el análisis de los índices de retención de Kovats de cada compuesto volátil detectado en la fase sólida. Para ello, se utilizó el programa *Chroma TOF* (incluido en el equipo) obteniendo diferentes parámetros derivados del análisis de las muestras. Los más relevantes son: % área, similitud, índice de retención de Kovats (IK) experimental y fórmula química del compuesto.

Identificación de los compuestos volátiles

Posterior a la eliminación de aquellos compuestos interferentes (disolventes, silanoides, etc.), se realizó la comparación de los índices de retención experimentales de los compuestos volátiles de ambas plantas con aquellos valores reportados en la biblioteca electrónica del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) y en la literatura.



7. RESULTADOS

7.1. Ensayos de identidad

Cromatografía en capa fina

Se realizaron pruebas de identidad por CCF de los compuestos marcadores constituyentes de la corteza de *Alnus acuminata* en los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico. Al revelar las placas cromatográficas con los reveladores vainillina sulfúrica y sulfato cérico amoniacal, se obtuvieron los cromatogramas que se muestran en la *Figura 20* en los cuales se observa cualitativamente la presencia de los cuatro estándares: el lup-20(29)-en-3,28-diol, como una banda morado claro ($F_R = 0.1956$); el β -sitosterol, como una banda violeta ($F_R = 0.3043$); el 20(29)-lupen-3 β -ol, como una banda violeta ($F_R = 0.4565$); y la 14-taraxeren-3-ona, como una banda azul cielo ($F_R = 0.8478$).

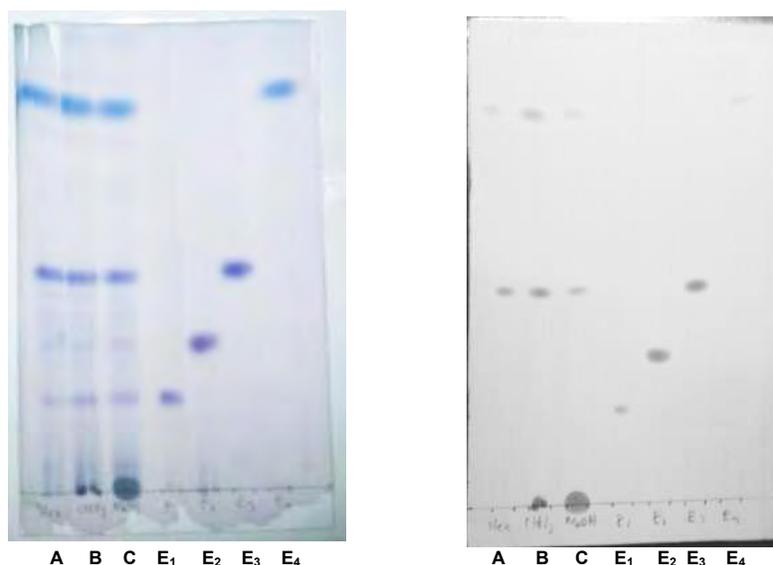


Figura 20. Cromatoplasmas de los tres extractos orgánicos y los respectivos estándares (cuatro). (A): Placa revelada con vainillina sulfúrica; (B): Placa revelada con sulfato cérico amoniacal.

Simbología: A - extracto hexánico; B - extracto clorofórmico; C - extracto metanólico; E_1 – lup-20(29)-en-2,28-diol; E_2 – β -sitosterol; E_3 – 20(29)-lupen-3 β -ol; E_4 – 14-taraxeren-3-ona.



7.2. Determinación de contenido de fenoles totales

Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Dado que en el análisis químico realizado a los extractos polares de la corteza de *A. acuminata* se aislaron e identificaron diarilheptanoides fenólicos¹⁰³ (Aguilar *et al.*, 2012), éste apartado tiene como fin realizar la cuantificación de fenoles totales del extracto de AcOEt de la corteza de *A. acuminata*. Por otra parte, se pretendió comprobar la factibilidad del empleo de la fórmula farmacopéica como una alternativa fácil y rápida para el cálculo de fenoles totales como parámetro de composición para el control de calidad de la corteza, comparando el resultado con el obtenido por el método de cuantificación de Folin-Ciocalteu, con ayuda de una curva de calibración de ácido gálico.

Se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de ácido gálico, de tal modo que se obtuviera una ecuación lineal (en función de las diferentes concentraciones y las absorbancias obtenidas de la reacción de Folin-Ciocalteu) que presentara una $r^2 \geq 0.99$, con la cual, sustituyendo valores de la absorbancia obtenida del experimento con las muestras (como abscisa) se pudiese conocer la concentración de equivalentes de ácido gálico presentes en un mililitro de la solución de extracto preparado (ordenada al origen).

Una vez realizado el procedimiento descrito en la parte experimental y obtenidas las diferentes absorbancias, se realizó el análisis estadístico de las diferentes curvas de calibración para seleccionar aquella cuyo coeficiente de correlación fuera el mayor (en relación a la dispersión de datos). Se utilizó el programa estadístico Excel (Microsoft Office 2010), realizándose el análisis de varianza de cada determinación. Los resultados obtenidos se muestran en el ANEXO II (a).

Se eligió trabajar con aquella curva cuyo coeficiente de correlación resultó mayor ($R^2 = 0.9865$) y además de acuerdo a los resultados derivados del *análisis de varianza*, al obtenerse valores residuales dentro del rango estipulado, con una F

¹⁰³ Aguilar, M.I., *et al.* (2011), *Antiinflammatory activities triterpenoids and diarylheptanoids of Alnus acuminata spp. arguta*, 49:1052-1057.



calculada mayor que el valor crítico de F y al tenerse valores del límite superior e inferior de la intersección circundantes del valor cero (comportamiento Gausseano). Se eliminaron aquellos valores de absorbancia mayores a 1, para obtener una menor dispersión de los datos, y para limitar los valores en un rango de absorbancias adecuadas acorde al método, ya que al considerarse aquellas absorbancias mayores a 1 (aproximadamente con valores de concentración mayores de 250 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico), se podría generar un comportamiento asintótico en la curva, disminuyendo así el coeficiente de correlación. Por esta razón se obtuvieron los resultados plasmados en el Anexo II (b). Así, en la curva seleccionada, se obtuvo un coeficiente de correlación mayor que el calculado anteriormente ($R^2 = 0.9936$). Con ello, se concluye que ésta fue la curva más adecuada para cuantificar los fenoles totales presentes en la corteza por medio del método de extrapolación lineal (Figura 21 (A)).

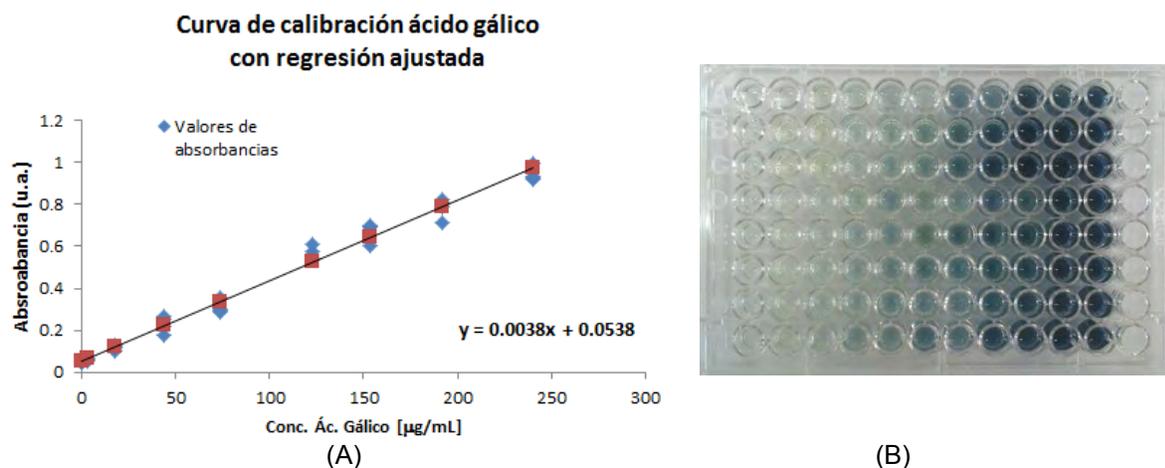


Figura 21. (A): Gráfico de la curva de calibración ajustada de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales; (B): Representación de la reacción colorimétrica de la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu en una placa de ELISA

Del gráfico anterior, se obtuvo la siguiente ecuación lineal:

Ecuación 4

$$y = 0.0038x + 0.0538$$



Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, utilizando la curva de calibración de ácido gálico

Una vez comprobada la factibilidad de la *Ecuación 4*, se llevó a cabo la cuantificación por medio de una extrapolación con la solución de extracto a 1.0 mg/mL por cuadruplicado.

Los absorbancias obtenidas presentaron valores que se salieron del rango de la curva de calibración, por lo que se realizó una dilución de 1:5 (en MeOH) para obtener un valor que entrara en el rango de concentraciones de la curva de calibración.

Después de realizar la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu y leer estas muestras en el espectrofotómetro, se llegó a los siguientes resultados:

Tabla 6. Resultados de la medición de absorbancia de la muestra de *A. acuminata* (1 mg/mL; dilución 1:5).

Absorbancia (u.a.) <i>Alnus acuminata ssp. arguta</i>
0.560
0.532
0.573
0.527

Estos valores de absorbancia se sustituyeron como las abscisas de la ecuación, llegándose a los siguientes valores de concentración equivalentes de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$).

Tabla 7. Concentración de fenoles totales de *A. acuminata* expresadas como equivalentes de ácido gálico (1 mg/mL; dilución 1:5)

Conc. equivalente de ácido gálico [$\mu\text{g/mL}$]
132.3
124.9
135.7
123.6



Las concentraciones anteriores fueron expresadas como EAG y se procedió a realizar el cálculo para obtener los mg EAG/g corteza, considerando lo siguiente:

- Concentración de la solución del extracto (1 mg/mL)
- Alícuota inicial de las muestras (20 μ L)
- Factor de dilución (D), calculado como:
$$D = \frac{(\text{Volumen total de reacción})(\text{dilución de la muestra})}{\text{Alícuota de la muestra}}$$
- Volumen de agua destilada (160 μ L)
- Volumen de reactivo de Folin-Ciocalteu (20 μ L)
- Volumen total de reacción por pozo (210 μ L)

Por lo tanto, la ecuación final es:

Ecuación 5

$$\text{mg EAG / g corteza} = \frac{CD(CE)(PE)}{W}$$

Donde:

C: Concentración de las muestras extrapoladas como EAG obtenidos de la ecuación lineal [μ g/mL]

D: Factor de dilución de la muestra

CE: Concentración de la solución del extracto preparado [1,0 mg/mL]

PE: Peso obtenido del extracto AcOEt inicial (16.8330 mg)

W: Peso inicial obtenido de la corteza (5.0795 g)

Con ésta fórmula, se llegó a los siguientes resultados expresados en mg EAG / g corteza:

Tabla 8. Contenido de fenoles totales en la corteza de *A. acuminata* obtenido a partir de la curva de calibración de ácido gálico

Contenido de fenoles totales [mg EAG / g corteza]
23.0
21.7
23.6
21.5



El contenido promedio de fenoles totales por gramo de corteza es de 22.5 ± 1.0 mg EAG / g corteza.

Cuantificación de fenoles totales utilizando la fórmula descrita en la farmacopea (FHEUM, 2013)

Resultados con referencia de ácido gálico

Se realizó la medición espectrofotométrica de 3 repeticiones (con 6 réplicas cada una) de la solución de ácido gálico preparada como se describe en la *Figura 19* (y siguiendo el procedimiento de la *Figura 17*). Los resultados fueron:

Tabla 9. Resultados obtenidos de la medición de absorbancias de las diferentes réplicas de ácido gálico (116.8 μ g/mL)

Absorbancias referencia			
Ácido gálico			
[116.8 μ g/mL]			
	I	II	III
	0.516	0.512	0.495
	0.507	0.509	0.502
	0.501	0.499	0.500
	0.517	0.488	0.507
	0.506	0.494	0.498
	0.500	0.510	0.503
Promedio	0.507833	0.510	0.5008
SD	0.0072502	0.009818	0.0041673
%C.V.	1.4277%	1.9558%	0.8321%

Considerando los valores de la *Tabla 9*, y los requisitos para validar el sistema (%C.V. no mayor de 2.0%), se puede concluir que el sistema es apto para utilizarse dentro de la fórmula farmacopéica propuesta, y al presentar la *réplica III* el menor porcentaje de C.V., fue elegida para utilizarse en el cálculo de la concentración de fenoles totales.

Resultados del extracto de AcOEt

Se llevó a cabo la medición espectrofotométrica de 6 repeticiones de la muestra del extracto de AcOEt a 1 mg/mL (siguiendo el procedimiento de la *Figura 17*), cuyos resultados fueron:



Tabla 10. Resultados obtenidos de la medición de absorbancias de las diferentes réplicas de la solución de extracto de AcOEt (1 mg/mL) de corteza diluido 1:5

Absorbancias. Solución de extracto [1,0 mg/mL]	
	0.510
	0.503
	0.497
	0.501
	0.509
	0.499
Promedio	0.5032
SD	0.053072
%C.V..	1.0548

Con estas seis repeticiones, y con base en las condiciones para aceptar los criterios de linealidad del sistema, se puede concluir que el sistema en general es apto para utilizarse dentro de la fórmula farmacopéica.

Con los resultados de los valores de absorbancia de la muestra y la referencia, se procedió a calcular la cantidad de fenoles totales presentes en la muestra como el siguiente ejemplo:

Ejemplo de cálculo.

Retomando la *Ecuación 5*, y tomando los valores de absorbancias indicadas en las *Tablas 9 y 10*, se tiene que:

$$(116.8 \mu\text{g/mL}) \left(\frac{0.21 \text{ mL} \cdot 5 \text{ mL}}{0.02 \text{ mL}} \right) \left(\frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \right) \left(\frac{0.510}{0.495} \right) \\ = 6.3 \text{ mg EAG}$$

Sacando proporciones de la cantidad de extracto inicial obtenido y considerando que se trabajó con una solución de extracto 1.0 mg/mL:

$$\begin{array}{r} 6.3 \text{ mg EAG} - 1 \text{ mg exto.} \\ x \quad - 16.8 \text{ mg exto.} \end{array}$$

$$x = 106.3 \text{ mg EAG}$$

Y teniendo una cantidad de corteza inicial pesada, se tiene:

$$\text{mg EAG} / \text{g corteza} = \frac{106.3 \text{ mg EAG}}{5.1 \text{ g corteza}}$$



= 20.9 mg EAG/g corteza

Siguiendo este tipo de razonamiento, se obtuvieron los resultados indicados en la *Tabla 11*.

Tabla 11. Contenido de fenoles totales en la corteza de *A. acuminata* calculado por fórmula farmacopéica

Contenido de fenoles totales [mg EAG / g corteza]
20.9
20.4
20.2
19.7
20.8
20.2

Por lo que el contenido promedio de fenoles totales por gramo de corteza es de 20.4 ± 0.4 mg EAG / g corteza.

7.3. Ensayos de la capacidad antioxidante

Una vez evidenciada la presencia de fenoles en el extracto, se desarrollaron cuatro pruebas con el fin de evaluar y cuantificar la capacidad antioxidante de éstos: capacidad de neutralización del radical DPPH, neutralización del catión ABTS, ensayo de FRAP y capacidad de blanqueamiento de β -caroteno. Los parámetros cinéticos evaluados en estos ensayos fueron: Área Bajo la Curva (ABC), Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC, o RDSC por sus siglas en inglés), Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}), Eficiencia Antirradical (EA) y Actividad Antioxidante (%AA). Como controles se utilizaron: Trolox, quercetina y (-)-epicatequina.



Ensayo de neutralización del radical libre ·DPPH

La capacidad de atrapamiento del radical libre DPPH (*Figura 22*) se determinó mediante el cálculo de DPPH remanente durante los 20 minutos de reacción, mediante la siguiente expresión:

Ecuación 6

$$\%DPPH_{\text{remanente}} = (A_{\text{mtra}} - A_{\text{bco}})/(A_{\text{ctrol}} - A_{\text{bco}}) * 100$$

Donde:

A_{mtra}: Absorbancia de la muestra

A_{bco}: Absorbancia blanco (MeOH)

A_{ctrol}: Absorbancia del control (solución metanólica de DPPH)

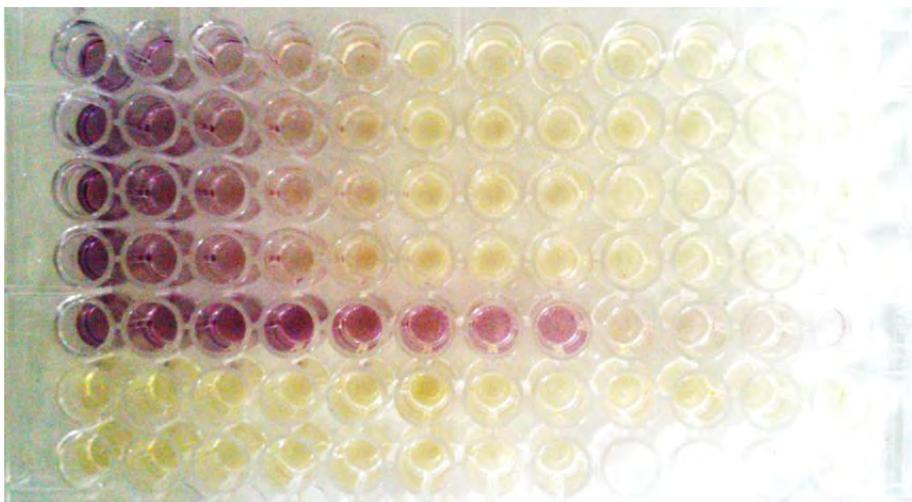


Figura 22. Representación de la reacción colorimétrica de atrapamiento del radical libre DPPH. La coloración morada hace alusión a la presencia del radical libre no neutralizado, mientras que la coloración amarilla es indicativa de la neutralización del mismo

En la *Figura 23* se muestra la cinética de reacción de las diferentes concentraciones del extracto metanólico (1, 0.5, 0.2, 0.04, 0.01 y 0.002 mg/mL) y de los tres compuestos de referencia utilizados (Trolox, (-)-epicatequina y quercetina, a 0.1 mg/mL) frente al radical libre DPPH:

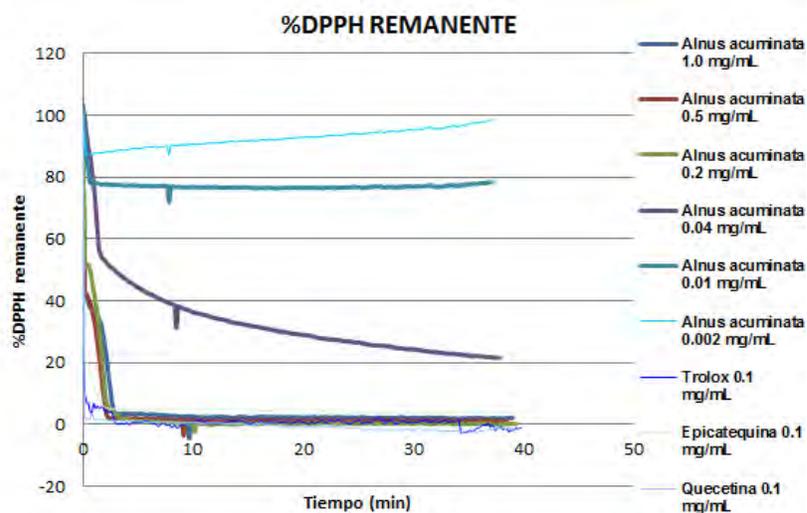


Figura 23. Representación de la cinética de reacción de neutralización del radical libre DPPH de las muestras del extracto metanólico utilizando tres compuestos de referencia.

Con los resultados procesados, se calcularon diferentes parámetros cinéticos para cuantificar la capacidad atrapadora del radical DPPH del extracto metanólico a diferentes concentraciones y de los compuestos de referencia utilizados. Éstos fueron: Área Bajo la Curva (ABC), Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC o RDSC), Concentración Inhibitoria media (CI_{50}) y Eficiencia Antirradical (EA) (Tabla 12). En el caso del TEAC, se construyó una curva de calibración con Trolox [derivada del tratamiento estadístico por análisis de varianza de tres réplicas realizadas. Ver ANEXO III (a)], cuya ecuación lineal permitió calcular los equivalentes de Trolox de las diferentes concentraciones de extracto evaluados.



Tabla 12. Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para el extracto metanólico en comparación con las referencias utilizadas para el ensayo de neutralización de DPPH.

	ABC	TEAC [mM]	CI ₅₀ [mg/mL]	EA [mL/mg min]
Conc. extracto MeOH <i>Alnus acuminata</i> [mg/mL]				
1	3788.1	363.7	-	-
0.5	3832.7	369.0	-	-
0.2	3874.1	372.3	-	-
0.04	2528.9	250.1	0.04	4.4
0.01	850.8	58.2	-	-
0.002	274.7	6.3	-	-
Trolox (0.1 mg/mL)	2011.7	251.8	0.01	15.0
Epicatequina (0.1 mg/mL)	2495.4	251.8	0.01	16.7
Quercetina (0.1 mg/mL)	4018.7	252.4	0.01	15.0

Ensayo de neutralización del catión ABTS^{•+}

La capacidad de atrapamiento del catión libre ABTS (*Figura 24*) se determinó mediante el cálculo de ABTS remanente durante los 6 minutos de reacción, mediante la siguiente expresión:

Ecuación 7

$$\%ABTS_{\text{remanente}} = (A_{\text{mtra}} - A_{\text{bco}}) / (A_{\text{ctrol}} - A_{\text{bco}}) * 100$$

Donde:

A_{mtra}: Absorbancia de la muestra

A_{bco}: Absorbancia blanco (Agua destilada)

A_{ctrol}: Absorbancia del control (solución acuosa de ABTS)

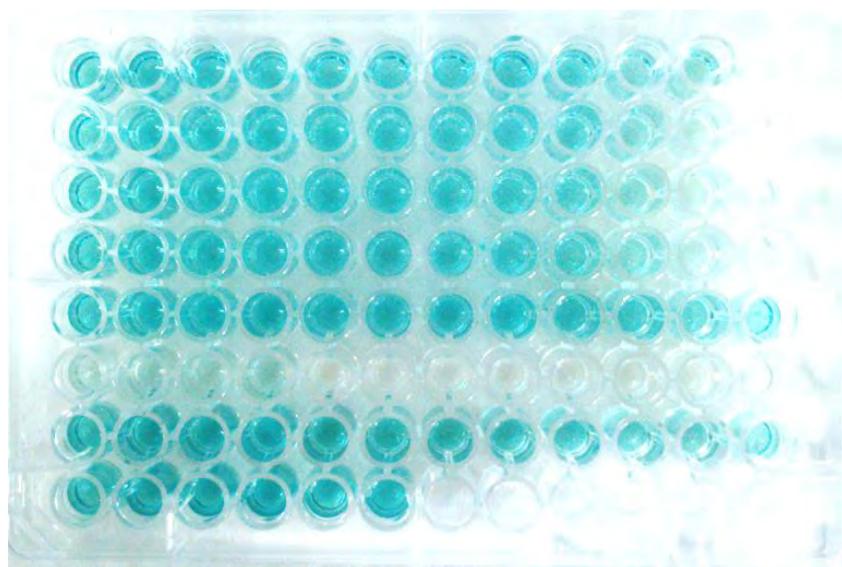


Figura 24. Representación de la reacción colorimétrica de neutralización del radical libre ABTS. La azul fuerte hace alusión a la presencia del radical libre no neutralizado, mientras que la solución transparente es indicativa de la neutralización del mismo

En la *Figura 24* se muestra la cinética de reacción de las diferentes concentraciones del extracto metanólico a 0.2, 0.04 y 0.01 mg/mL y de los tres compuestos de referencia utilizados (Trolox, (-)-epicatequina y quercetina a 1 mg/mL) frente al catión libre ABTS.

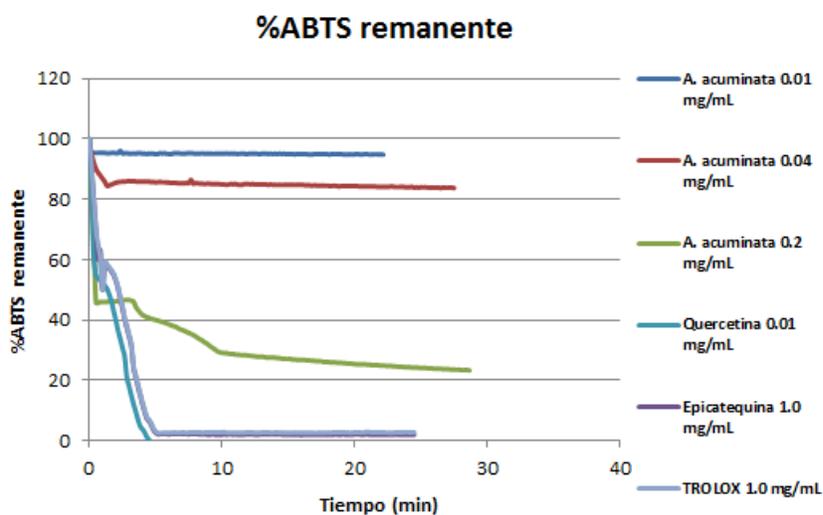


Figura 25. Representación de la cinética de reacción de neutralización del catión libre ABTS de las muestras del extracto metanólico utilizando tres compuestos de referencia.



Con los resultados procesados, se calcularon diferentes parámetros cinéticos para cuantificar la capacidad atrapadora del catión libre ABTS del extracto metanólico a diferentes concentraciones y de los compuestos de referencia utilizados. Éstos son: Área Bajo la Curva (ABC), Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC o RDSC), Concentración Inhibitoria media (CI_{50}) y Eficiencia Antirradical (EA). En el caso del TEAC, se construyó una curva de calibración con Trolox [derivada del tratamiento estadístico por análisis de varianza de tres réplicas realiza. Ver ANEXO III (b)], cuya ecuación lineal permitió calcular los equivalentes de Trolox de las diferentes concentraciones de extracto evaluados. Los parámetros cinéticos calculados se muestran en la *Tabla 13*.

Tabla 13. Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para el extracto metanólico en comparación con las referencias utilizadas para el ensayo de neutralización del catión ABTS.

	ABC	TEAC [mM]	CI50 [mg/mL]	EA [mL/mg min]
Conc. extracto MeOH <i>Alnus acuminata</i> [mg/mL]				
1	-	498.0	-	-
0.5	49.9	382.4	-	-
0.2	2055.5	148.3	0.2	10.0
0.04	412.3	53.9	-	-
0.01	0.4	9.1	-	-
0.002	0.5	2.2	-	-
Trolox (0.1 mg/mL)	2234.2	494.9	1	0.4
Epicatequina (0.1 mg/mL)	219.5	48.3	0.1	6.7
Quercetina (0.1 mg/mL)	256.0	88.0	0.1	5.0

Ensayo para determinar el poder antioxidante/reductor de Fe^{3+} (FRAP')

La capacidad de reducción del Fe^{3+} por las diferentes concentraciones de extracto MeOH y las referencias mencionadas se determinó mediante la extrapolación de las diferentes absorbancias obtenidas a los 30 minutos de reacción (como punto final de reacción) (*Figura 26*).

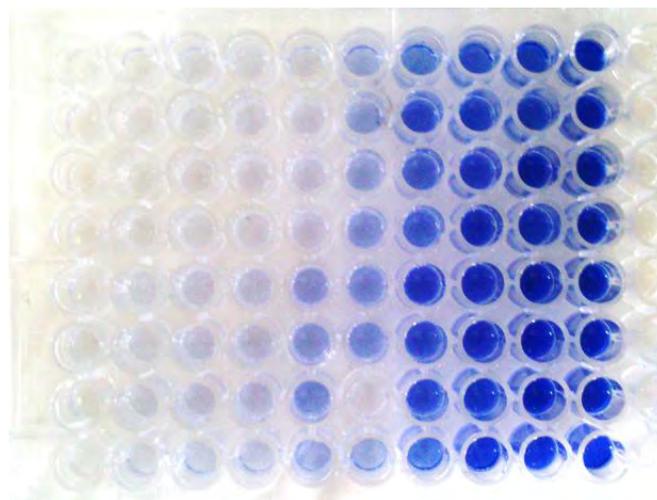


Figura 26. Representación de la reacción colorimétrica de la capacidad de reducción del Fe^{3+} . La solución transparente hace alusión a la presencia del Fe^{3+} no reducido, mientras que la coloración azul fuerte es indicativa de la reducción del mismo.

Para esta determinación, se realizaron dos curvas de calibración [derivadas del tratamiento estadístico por análisis de varianza de tres réplicas realizadas. Ver ANEXO III (c)], cuyas ecuaciones lineales permitieron calcular los equivalentes de ácido ascórbico y de Trolox de las diferentes concentraciones de extracto ensayadas mediante la extrapolación de las absorbancias obtenidas. Estas curvas de calibración se representan en las *Figuras 27 y 28*.

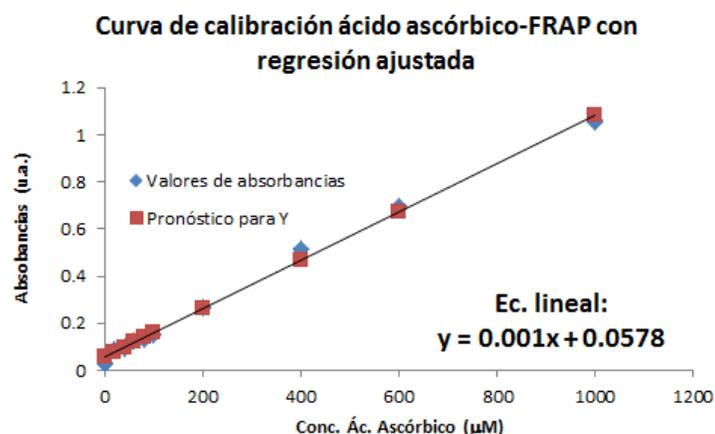


Figura 27. Curva de calibración de ácido ascórbico (0-1000 μM) para el ensayo de FRAP

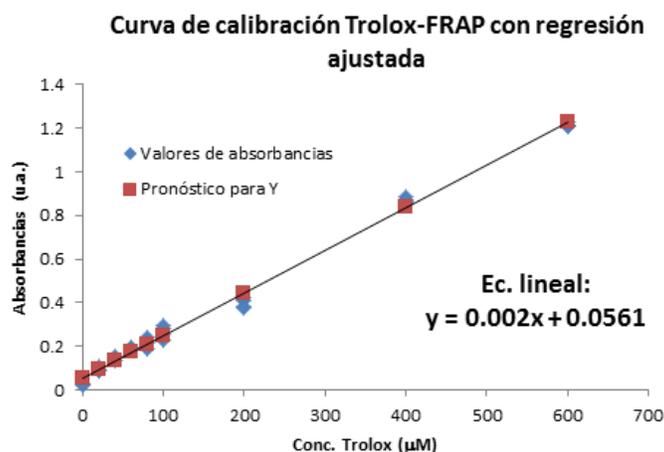


Figura 28. Curva de calibración de Trolox (0-600 μM) para el ensayo de FRAP

Con estas curvas, se procedió a extrapolar las absorbancias obtenidas al minuto 30, obteniéndose los resultados resumidos en la *Tabla 14*:

Tabla 14. Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para el extracto metanólico en comparación con las referencias utilizadas para el ensayo de FRAP.

Extracto y/o referencia. Concentración	Equivalente ác. áscórbico [μM]	Equivalente Trolox [μM]
<i>Alnus acuminata</i> [0.01 mg/mL]	38.5	20.1
Trolox [0.01 mg/mL]	75.9	38.8
Quercetina [0.01 mg/mL]	109.2	55.5
(-)-epicatequina [0.01 mg/mL]	75.5	38.6

Capacidad de neutralizar la lipoperoxidación por medio del ensayo de blanqueamiento de β -caroteno

Para determinar la capacidad antioxidante del extracto metanólico para neutralizar el radical generado por la reacción entre el ácido linoleico y el β -caroteno se utilizó como control positivo Trolox (0.5 mg/mL) y como blanco de



reacción MeOH (*Figura 28*). Ésta capacidad se calculó con la expresión descrita en la literatura¹⁰⁴:

Ecuación 8

$$\%AA = (DRc - DRs)/DRc * 100$$

Donde:

DRc: Velocidad de degradación del control
DRs: Velocidad de degradación de la muestra

Expresiones de las que se tiene que:

$$DRc \text{ o } DRs = \frac{\ln\left(\frac{a}{b}\right)}{60}$$

Donde:

a: Absorbancia al tiempo cero
b: Absorbancia al tiempo 60 (min)



Figura 29. Representación de la reacción colorimétrica del ensayo de blanqueamiento de β -caroteno. El tubo de ensayo de la izquierda hace alusión al inicio de la reacción de la muestra con el extracto metanólico de la corteza, mientras que en el tubo de la derecha se puede observar la decoloración del β -caroteno.

¹⁰⁴ Wang, W. (2008), *Antioxidative activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to its main components*, 108:1019–1022.



Previo al ensayo, se realizó una prueba para evaluar las posibles concentraciones que permitieran retardar la peroxidación de los lípidos utilizando concentraciones de extracto mayores. Sin embargo, a fin de observar el efecto del blanqueamiento, se trabajó con las siguientes concentraciones: 2, 1, 0.2, 0.02 y 0.004 mg/mL, utilizando como control positivo Trolox (0.5 mg/mL). Todas las pruebas se realizaron por triplicado, cuyos promedios se muestran en la *Tabla 15*.

Tabla 15. Resumen de los parámetros obtenidos de capacidad de lipoperoxidación mediante el ensayo de blanqueamiento de β -caroteno

Extracto MeOH <i>Alnus acuminata</i>	Concentración [mg/mL]	%AA (60 min)
1	2	67.8
2	1	66.7
3	0.2	63.8
4	0.02	60.5
5	0.004	45.4

7.4. Determinación de compuestos volátiles por HS-SPME-EM-TOF de la corteza de *A. acuminata* y de la raíz *H. longipes*.

Esta técnica se desarrolló con el fin de extraer, detectar e identificar selectivamente compuestos volátiles presentes en la corteza de *A. acuminata* y en la raíz *H. longipes*, utilizando la técnica de microextracción en fase sólida (por sus siglas en inglés, SPME) y la instrumentación analítica CG-EM-TOF (Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas con Tiempo de Vuelo). La técnica emplea un tipo de fase sólida que permite realizar extracciones selectivas debido a sus características de componentes polares, no polares y de mediana polaridad.

Los compuestos volátiles presentes en las dos muestras fueron identificados mediante la comparación de los índices de Kovats obtenidos experimentalmente con aquellos reportados en la literatura y en la base de datos de NIST, en el apartado de caracterización de compuestos por Cromatografía de Gases. Se identificaron 32 compuestos en la corteza de *A. acuminata* (*Figura 30*), mientras que en la raíz de *H. longipes* se identificaron 39 (*Figura 31*). Los compuestos identificados se muestran en las Tablas 16 y 17, ordenados de acuerdo a sus



tiempos de retención, así como por el valor de los índices de Kovats teóricos y experimentales.


Tabla 16. Compuestos volátiles detectados en la corteza de *A. acuminata*

# Pico	Nombre	% Área	R.T. (s)	IR _e	IR _t	Similitud	Método de identificación
1	Heptanal	1,9384	267,847	970,01	903	867	MS / IK
2	1,2,3-trimetil- benceno	3,9377	339,397	1082,9	1034	970	MS / IK
3	1,2-dietil- benceno	0,1391	355,447	1112,5	1056,7	890	MS / IK
4	Ocimeno	2,0142	356,447	1114,4	1052	770	MS / IK
5	2-etil-1-hexanol	8,5240	364,147	1128,6	1030	940	MS / IK
6	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	0,7487	386,347	1169,6	NE	871	IP
7	pentil-ciclopropano	1,9493	390,197	1176,7	NE	827	IP
8	1-etil-3-etil- benceno	0,7572	394,947	1185,4	NE	866	IP
9	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	4,4213	401,297	1197,1	1112	820	MS / IK
10	Nonanal	4,4213	401,597	1197,7	1108	920	MS / IK
11	2,4-dimetilestireno	0,3477	420,647	1241,2	NE	839	IP
12	6,7-dimetoxi-1-metil-4-(3,4-dimetilfenil)-isoquinolina	1,3275	432,697	1269,1	NE	647	IP
13	2-Dodecanona	1,3383	443,697	1294,5	NE	936	IP
14	1-metilen-1H-indeno	9,8277	449,497	1307,9	NE	918	IP
15	Decanal	9,6368	449,947	1309	1228	946	MS / IK
16	Estragol	9,7733	450,647	1310,6	1196	808	MS / IK
17	3-tert-butil-2-pirazolin-5-ona	0,5778	484,547	1389	NE	670	IP
18	N-(2-acetilciclohexilideno)ciclohexilamina	0,5420	489,297	1400	NE	729	IP
19	Benzocicloheptatrieno	0,7174	505,547	1443,5	NE	859	IP
20	2-metil-2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metiletil) propiléster del ácido propanoico	9,1251	512,647	1462,6	NE	950	IP
21	2-metil-3-hidroxi-2,4,4-trimetilpentil éster del ácido propanoico	17,9576	522,897	1490	NE	892	IP
22	Bifenil	0,4708	532,347	1515,3	1381,8	897	MS / IK
23	Difenil éter	2,2745	538,247	1531,1	1396	851	MS / IK
24	1,3,4,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametil-ciclopenta[γ]-2-benzopirano	0,4279	685,997	1994,2	NE	831	IP
25	4-dimetil-bencenobutanol	2,2745	538,997	1533,2	NE	766	IP
26	2,4-bis(1,1-dimetiletil)-fenol	0,4890	576,597	1639,9	1512	928	MS / IK

**Tabla 16.** Compuestos volátiles detectados en la corteza de *A. acuminata* –continuación–

27	2-metil-1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanodil éster del ácido propanoico	0,9804	597,847	1707	NE	916	IP
28	1,3,4,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametil- ciclopenta [γ]-2-benzopirano	0,6486	685,997	1994,2	NE	831	IP
29	1,1'-oxibis-octano	0,3260	719,247	2114	NE	869	IP
30	Dihexil éster-1,2-ácido bencenodicarboxilico éster	0,5631	722,397	2125,4	NE	905	IP
31	10-Heneicoseno	1,8361	965,797	3075,4	NE	918	IP
32	1-Heptacosanol	1,2689	1013	3260,9	NE	927	IP

Simbología: **MS / IK:** Espectrometría de masas / Índice de Kovats; **IP:** Índice Presuntivo; **NE:** No Encontrado; **IR_e:** Índice de retención experimental; **IR_t:** Índice de retención teórico

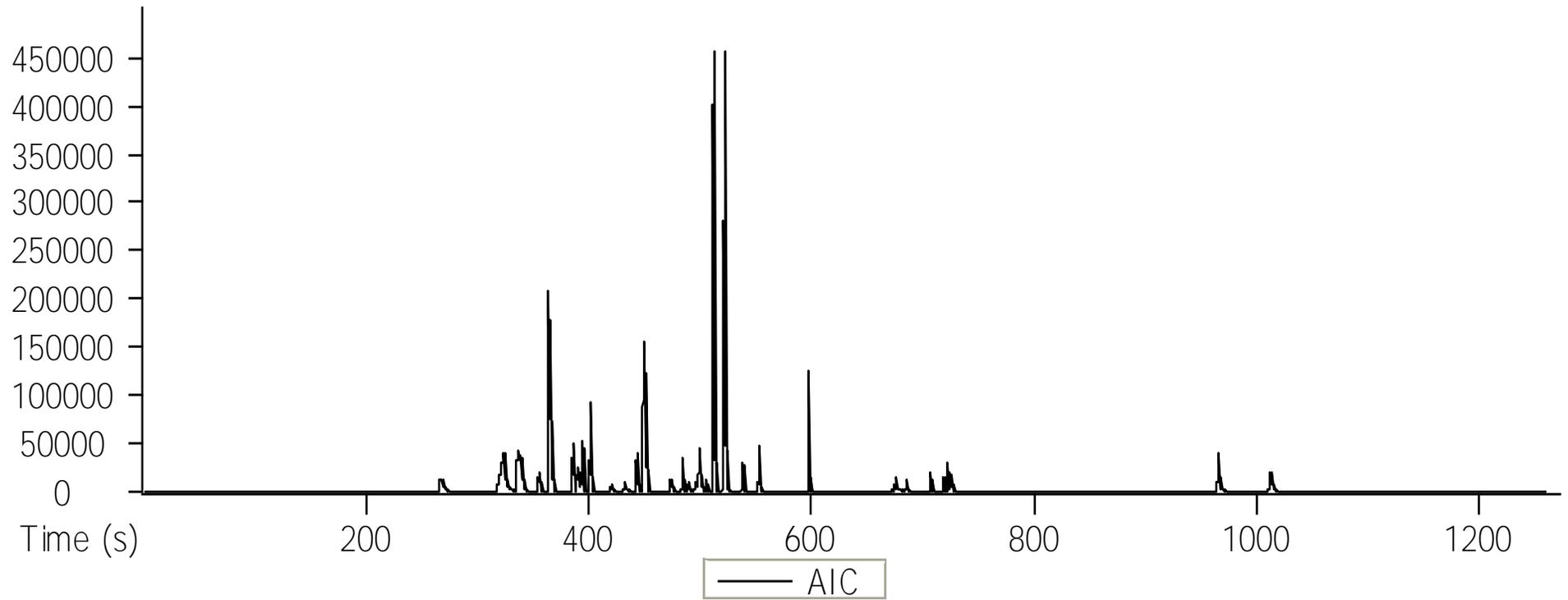


Figura 30. Cromatograma de la corteza de *A. acuminata* obtenido con la fibra DVB/CAR/PDMS (color gris) por CG-EM.


Tabla 17. Compuestos volátiles detectados en la raíz *H. longipes*

# pico	Nombre	% Area	R.T. (s)	IR _e	IR _t	Similitud	Método de identificación
1	1,7,7-trimetil-triciclo[2.2.1.0(2,6)] heptano	1,4128	277,209	981	940	956	MS / IK
2	2,6,6-trimetil-biciclo[3.1.1] hept-2-eno	7,0439	286,809	991	944	967	MS / IK
3	Camfeno	22,2012	300,559	1011	964	881	MS / IK
4	α-Pineno	4,2406	319,359	1046	990	964	MS / IK
5	o-Cimeno	7,0173	352,959	1108	1033	968	MS / IK
6	D-Limoneno	7,0269	354,259	1110	1039	908	MS / IK
7	2-etil-1-hexanol	0,2811	362,159	1125	1040	816	MS / IK
8	α -felandreno	0,1708	371,709	1143	1013	797	IP
9	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	0,1555	384,709	1167	NE	913	IP
10	6-campenol	0,2080	392,859	1182	1110	880	MS / IK
11	Nonanal	0,5467	400,359	1195	1108	934	MS / IK
12	1,7,7-trimetil-(1S-endo)-biciclo[2.2.1]heptan-2-ol	0,5078	435,609	1276	1173	865	MS / IK
13	1,2-dimetil-4-metilen-ciclopenteno	0,5957	436,459	1278	NE	864	IP
14	7,7-dimetil-biciclo[2,2,1]heptan-2-ol	0,2850	437,909	1281	NE	777	IP
15	(3S,6S)-2,2,6-trimetil-6-viniltetrahidro-piran-3-ol	0,4995	439,459	1285	1186	746	MS / IK
16	2-etil-3-metoxi-2-ciclopentenona	3,2549	457,559	1327	NE	685	IP
17	2-dodecanona	0,5191	486,459	1393	1388	967	MS / IK
18	α-Vatireneno	1,2557	514,009	1466	NE	847	IP
19	Octahidro-1,7 α -dimetil-5-(1-metiletil)-, [1S-(1α,2α,3aβ,4α,5α,7aβ,8S)], 1,2,4-Meteno-1H-indeno	5,7523	516,809	1474	1370	794	MS / IK
20	(+)-ciclosativeno	5,7523	517,109	1475	1369	888	MS / IK
21	α-copaeno	1,7877	518,759	1479	1380	892	MS / IK
22	2-metil-3-hidroxi-2,4,4-trimetilpentil ester del ácido propanoico	0,3158	520,059	1482	NE	790	IP
23	1-metil-4-(1,2,2-trimetilciclopentil)-(R)-benceno	0,2616	527,509	1502	1505	628	MS / IK


Tabla 17. Compuestos volátiles detectados en la raíz *H. longipes* –continuación–

24	Isoledeno	9,4383	533,109	1517	NE	827	IP
25	(-)-B-bourboneno	2,3896	546,009	1552	1388	750	MS / IK
26	cis-Thujopseno	4,6656	546,259	1553	1431	620	MS / IK
27	8,8,9-Trimetil-deca-3,5-dieno-2,7-diona	0,5356	552,209	1569	NE	724	IP
28	Aristoleno	0,5356	552,559	1570	NE	863	IP
29	Seychelleno	0,7247	552,609	1570	1460	887	MS / IK
30	Longifoleno-I2	1,6635	557,959	1584	1448	731	MS / IK
31	Aromadendreno	0,7890	559,559	1588	1463	876	MS / IK
32	Octahidro-4-metil-8-metilen-7-(1-metiletil)-[1S-(1 α ,3 $\alpha\beta$,4 α ,7 α ,7 $\alpha\beta$)], 1,4-Metano-1H-indeno	0,3986	571,159	1623	NE	854	IP
33	(-)- α -Panasinseno	0,4339	575,659	1637	NE	854	IP
34	$\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -6,8-tetrametil-triciclo[4.4.0.0(2,7)]dec-8-ene-3-metanol	0,3985	586,209	1670	1541	876	MS / IK
35	Óxido de cariofileno	0,3985	586,609	1672	1596	749	MS / IK
36	2,2,4-trimetil-3-carboxiisopropil isobutil éster del ácido pentanoico	4,0933	596,809	1704	1581	861	MS / IK
37	3-oxo-2-pentil-metil éster del ácido ciclopentaneacético	0,3726	625,409	1794	NE	750	IP
38	4,8,12,15,15-pentametil-[1R-(1R*,3E,7E,11R*,12R*)]-biciclo[9.3.1]pentadeca-3,7-dien-12-ol	1,7162	740,109	2190	NE	855	IP
39	3-metilen-1,7,7-trimetilbiciclo[2.2.1]hept-2-il éster del ácido ciclopentanecarboxílico	0,1302	783,709	2360	NE	797	IP

Simbología: **MS / IK:** Espectrometría de masas / Índice de Kovats; **IP:** Índice Presuntivo; **NE:** No Encontrado; **IR_e:** Índice de retención experimental; **IR_t:** Índice de retención teórico

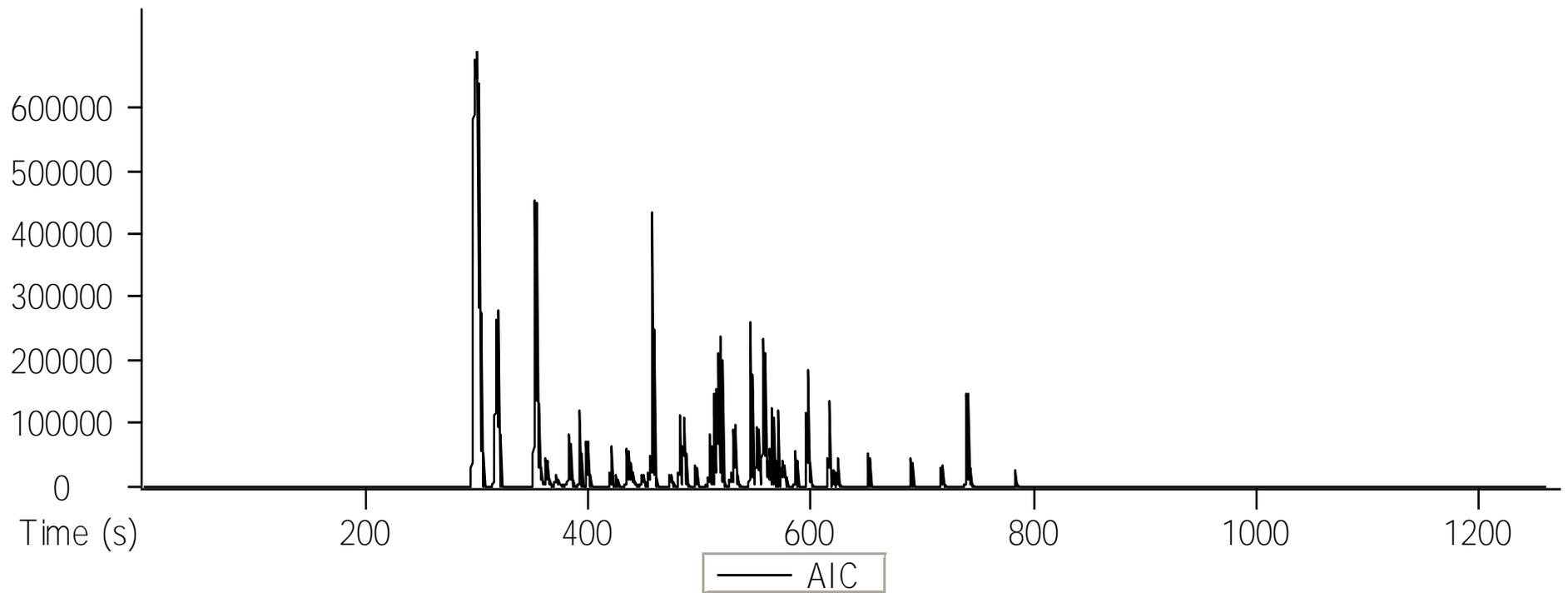


Figura 31. Cromatograma de la raíz de *H.longipes* obtenido con la fibra DVB/CAR/PDMS (color gris) por CG-EM.



8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1. Ensayos de identidad

Pruebas de identidad por CCF de los compuestos marcadores mayoritarios constituyentes de la corteza de *A. acuminata*

Por medio de la técnica de CCF¹⁰⁵, se puede observar que la extracción con los tres disolventes fue eficiente, lo cual se refleja en las bandas abundantes, uniformes y claras que se evidenciaron con ambos reveladores en la placa. Además, las concentraciones utilizadas de cada extracto y referencia fueron las adecuadas.

Un factor crítico en el tratamiento del revelado fue la temperatura de calentamiento. En el caso de la cromatoplaqueta revelada con sulfato cérico amoniacal (*Figura 20b*) presentó bandas con menor intensidad, esto porque se tuvo que supervisar a fin de evitar que ésta se quemara. En el caso de la cromatoplaqueta revelada con vainillina sulfúrica (*Figura 20a*), el revelado fue casi inmediato, apreciándose bandas más abundantes y de mayor intensidad tanto de las referencias como de los diferentes extractos.

8.2. Determinación de contenido de fenoles totales

Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu y fórmula farmacopéica

La determinación del contenido de fenoles totales es muy importante, ya que los parámetros obtenidos permiten evaluar el potencial antioxidante de la mayoría de los productos naturales¹⁰⁶, además de que es una prueba de amplia aplicación como control de calidad para diversas materias vegetales descritas en la FHEUM. Se realizó la cuantificación de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu y utilizando un método farmacopéico, con el fin de comparar los resultados obtenidos y comprobar la factibilidad de ambos métodos. En el caso del método farmacopéico,

¹⁰⁵ Navarrete, A., et al. (2009), *Monografía científica de plantas medicinales de México. Cuachalalate*, pp. 17.

¹⁰⁶ Prior, R. L. et al. (2005), *Standardized Methods for the Determination of Antioxidants Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements*, 53:4290-4302.



es una expresión general que se utiliza en gran número de materias vegetales para cuantificar los fenoles totales en la FHEUM. Como se mencionó en la justificación, con éstos resultados se pretende comprobar que ambos métodos son equivalentes para que pueda realizarse la propuesta monográfica que incluya esta cuantificación y fórmula dentro de la farmacopea como prueba de calidad.

Se tiene evidencia por estudios previos que el extracto metanólico de la corteza de *A. acuminata* presenta una gran cantidad de compuestos fenólicos. Comparando el resultado obtenido a partir de la cuantificación por el método de Folin-Ciocalteu y el obtenido por la fórmula farmacopéica propuesta, se obtuvieron valores similares, hecho que permite concluir la factibilidad de ambos métodos de cuantificación. A modo de propuesta, si se continúa el presente trabajo, sería factible la aplicación de un factor de corrección para comprobar que ambos métodos son comparables, y que al aplicarlo, este factor de corrección, permita obtener un resultado más preciso.

8.3. Ensayos de la capacidad antioxidante

Tras comprobar y cuantificar la presencia de fenoles totales en el extracto de AcOEt de la corteza de *A. acuminata*, se realizaron los ensayos para evaluar el potencial antioxidante utilizando los ensayos de: DPPH, ABTS, FRAP y blanqueamiento de β -caroteno. El compuesto de referencia que se utilizó para comparar y cuantificar la capacidad antioxidante del extracto metanólico y del resto de compuestos de referencia y con el que se calcularon los parámetros cinéticos fue el Trolox. La Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (*TEAC*), indica el número de radicales de DPPH o ABTS neutralizados por una molécula del antioxidante¹⁰⁷; la Capacidad Inhibitoria Media (*CI₅₀*) se define como aquella concentración del compuesto y/o antioxidante que se requiere para reducir o neutralizar el 50% de la cantidad de DPPH o ABTS presente en el medio de reacción a comparación de la cantidad existente inicial. Éste parámetro cinético permite caracterizar de primera instancia el poder antioxidante de una muestra; en

¹⁰⁷ Roginsky, et al. (2005) *Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food*, 92:235-254.



cuanto al área bajo la curva (ABC), es un parámetro que permite evaluar la capacidad antioxidante en términos de velocidad y eficiencia de la reacción en cuanto al atrapamiento y neutralización del radical en cuestión¹⁰⁸; y la eficiencia antirradical (EA) permite comparar la capacidad de atrapamiento de los radicales¹⁰⁹.

Para la evaluación de los resultados obtenidos, se debe hacer mención de que mientras el valor de los parámetros cinéticos ABC y EA sea más pequeño, es indicativo de que existe mayor presencia de moléculas antioxidantes, se requiere una mínima concentración de la muestra para inhibir una mayor cantidad de radicales libres y con ello el poder antioxidante de la muestra es mayor. Por otra parte, valores de TEAC elevados indican una gran capacidad antioxidante.

Ensayo de neutralización del radical libre ·DPPH

La neutralización del radical DPPH se lleva a cabo por dos mecanismos: uno de ellos involucra la transferencia de un hidrógeno radical (H·) (ET, electron transfer) y otro la transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT, hydrogen atom transfer). El mecanismo que se observa en mayor medida es el de ET¹¹⁰

Los resultados resumidos en la *Tabla 12* hacen referencia a que la actividad antioxidante del extracto metanólico total frente al radical DPPH es comparable con la de los tres compuestos referencias trabajados: (-)-epicatequina, quercetina y Trolox.

Los valores obtenidos de ABC del extracto a una concentración de 0.04 mg/mL o mayor son comparables con los obtenidos por el Trolox y (-)-epicatequina a 0.1 mg/mL, lo que muestra una mayor actividad antioxidante por parte del extracto. Esto indica que la rapidez de neutralización de los radicales libres fue mayor en la muestra.

¹⁰⁸ Apak, R. et al. (2007) *Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay*, 12:1496-1547.

¹⁰⁹ Cheng, Z. et al. (2006) *High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay*, 54:7429-7436.

¹¹⁰ Ou, B. et al. (2005) *The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays*, 53:1841-1856.



En cuanto a los valores de TEAC obtenidos, a concentraciones mayores a 0.2 mg/mL de extracto metanólico, se aprecia que una mayor cantidad de radicales fueron neutralizados en comparación con las referencias.

Por otro lado, respecto a la Cl_{50} (Figura 23) se observa que a una concentración de 0.04 mg/mL de extracto metanólico fue neutralizado el 50% de los radicales libres. Este resultado fue mayor que los obtenidos por las referencias, lo que indica que se requiere menor concentración del extracto para neutralizar a los mismos radicales en comparación con las concentraciones de los compuestos de referencia trabajados. Según la literatura¹¹¹, la (-)-epicatequina y la quercetina son ejemplo de una serie de compuestos de la familia de los flavonoides con gran capacidad antioxidante; en el caso de la (-)-epicatequina, la gran capacidad antioxidante es conferida por el residuo de catecol del anillo B, el cual puede estabilizar el radical libre presente en el medio, de modo que presenta una estructura química tal que genera una deslocalización electrónica hasta estabilizar el aroxi-radical generado¹¹². En la Figura 32 se representan los dos mecanismos de estabilización del ion o radical generado.

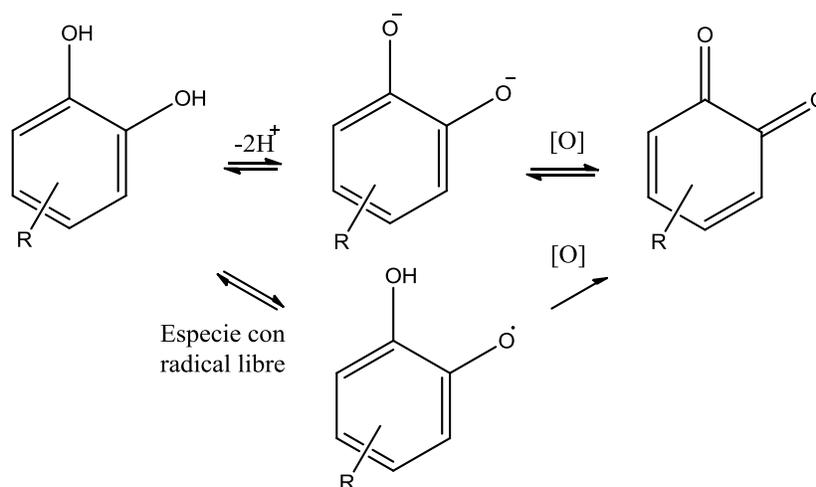


Figura 32. Estabilización del aroxi-radical y del ion fenolato en compuestos fenólicos (grupo catecol), indicado en la literatura¹¹³.

¹¹¹ Kurihara, K.K. *et al.* (1999) *Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation*, 362:79-86.

¹¹² Prochazkova, D. *et al.* (2011), *Antioxidant and peroxidant properties of flavonoids*, 82:513-523.

¹¹³ Peterson, D.G., *Patent application publication*, Feb. 10, 2005. Pub. núm. US 2005/0031771 A1.



Con respecto a la Eficiencia Antirradical (EA), las tres sustancias de referencia presentaron mayor eficiencia que el extracto a la concentración de 0.04 mg/mL, de lo cual se puede decir que las referencias son capaces de neutralizar el radical DPPH de una forma más eficiente que el extracto. Éste parámetro correlaciona con los valores obtenidos de TEAC y de Cl_{50} , por lo que existe una relación entre ambos parámetros, con lo cual se puede establecer que para que un compuesto sea considerado como un buen atrapador o neutralizador de radicales libres, éste debe tener valores de TEAC altos y Cl_{50} bajos.

Ensayo de neutralización del catión ABTS^{•+}

Los resultados obtenidos en la *Tabla 13* hacen referencia a que la actividad antioxidante del extracto metanólico total frente al radical ABTS comparada con las tres referencias utilizadas. Los valores obtenidos de ABC del extracto a una concentración de 0.2 mg/mL son casi similares a los obtenidos por el Trolox a 0.1 mg/mL, y presenta valores mayores a los obtenidos con la (-)-epicatequina y la quercetina a 0.1 mg/mL, presentando mayor actividad antioxidante. Esto indica que la rapidez de neutralización fue mayor o equivalente en la muestra respecto a las referencias.

En cuanto a los valores de TEAC obtenidos, a una concentración de extracto metanólico de 0.2 mg/mL se aprecia una mayor cantidad de radicales neutralizados respecto a la (-)-epicatequina y la quercetina, mientras que la cantidad de radical neutralizada por 1 mg/mL de extracto es similar a la obtenida por el Trolox a 0.1 mg/mL. Esto hace ver que para este ensayo, el comportamiento de las referencias fue variable dependiendo de las concentraciones del extracto evaluadas, así como de las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción (exposición a la luz, lectura de absorbancias a tiempo definido, manipulación de la placa, etc.).

Por otro lado, respecto a la Cl_{50} calculada en la *Figura 25* se observa que a la concentración de 0.2 mg/mL del extracto metanólico, 50% de los radicales libres es neutralizado. Este resultado presuntivo fue mayor que los obtenidos por las



referencias, lo que indica que se requiere menor cantidad de extracto para neutralizar los radicales a comparación de las referencias.

Respecto a la Eficiencia Antirradical (EA), el extracto a concentración de 0.2 mg/mL presentó mayor eficiencia en comparación con las referencias, lo que indica que el extracto tiene gran capacidad antioxidante frente al radical ABTS.

Ensayo para determinar el poder antioxidante/reductor de Fe³⁺ (FRAP')

Para éste ensayo, como fue descrito anteriormente para la prueba de neutralización del radical DPPH, se lleva a cabo un mecanismo de neutralización por la transferencia de un electrón, reduciendo el Fe³⁺ (forma oxidante) en Fe²⁺ (forma estable no oxidante). Con base en lo descrito en la literatura¹¹⁴, esta capacidad para reducir la especie oxidada parece estar relacionada con el grado de hidroxilación de los compuestos presentes, así como de la conjugación de los compuestos polifenólicos.

Conforme a los resultados obtenidos (*Tabla 14*), se puede observar que la actividad reductora no fue tan significativa como aquella evidenciada con las referencias a las mismas concentraciones (0.01 mg/mL); sin embargo, se comprobó que el extracto metanólico sí presentó una capacidad donadora de electrones, por lo cual, si se trabajara a concentraciones mayores de extracto, esta capacidad se incrementaría.

Capacidad de neutralizar la lipoperoxidación por medio del ensayo de blanqueamiento de β-caroteno

Este ensayo permitió evaluar la capacidad antioxidante de los polifenoles presentes en el extracto metanólico mediante la inhibición de la autooxidación de los lípidos. La reacción se lleva a cabo mediante la donación de un hidrógeno al

¹¹⁴ Pulido, R. et al. (2000) *Antioxidant capacity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay*, 48:3396-3402.



radical peroxilo generado de la reacción entre el ácido linoléico y el β -caroteno hasta estabilizarlo¹¹⁵.

Los resultados plasmados en la *Tabla 15* muestran que el extracto posee la capacidad de evitar la oxidación del β -caroteno, reflejado en la disminución de la absorbancia en función del aumento de la actividad antioxidante (%AA). La actividad más significativa fue a una concentración de extracto de 0.1 mg/mL respecto al control positivo de Trolox a 0.5 mg/mL. Pese a este hecho, la capacidad antioxidante del extracto no fue tan significativa.

Ensayos de la actividad antioxidante. Relación de resultados

Los resultados obtenidos en los ensayos de DPPH y ABTS son variables. Se observa que los valores de ABC son mayores en el ensayo del DPPH, sin embargo, el área del ensayo de ABTS debió ser mayor, ya que este radical reacciona indistintamente con cualquier donador de $-H^+$, por lo cual, y con base en los resultados obtenidos, éste no contribuye significativamente a la actividad antioxidante. Esta diferencia también pudo generarse por la sensibilidad de los ensayos, ya que al poner en contacto la reacción con la luz la velocidad de la reacción aumentaba y/o disminuía en función del cambio de coloración, por lo cual fueron factores difíciles de controlar. En el caso de las referencias trabajadas, estas presentaron valores de ABC similares, ya que éstas siempre presentan los mismos donadores de hidrógenos en su molécula.

En el caso de CI_{50} , se obtuvieron valores para el ensayo de DPPH mayores que para el ensayo de ABTS, esto debido a la falta de especificidad por parte del radical ABTS, neutralizando de esta forma mayor cantidad de radicales. Por ello se requiere mayor cantidad de antioxidantes.

La diferencia en los parámetros calculados para los ensayos muestra que los antioxidantes reaccionan dependiendo de la naturaleza del radical, por lo que la

¹¹⁵ Roginsky, V. et al. (2005), *Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food*, 92:235-254.



actividad de los compuestos fenólicos depende del medio de reacción y las condiciones a las que se le somete.

8.4. Determinación de compuestos volátiles por HS-SPME-EM-TOF de la corteza de *A. acuminata* y de la raíz *H. longipes*.

Para la determinación de los compuestos volátiles se realizó un proceso de microextracción en fase sólida (DVB/CAR/PDMS, de color gris), mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los ensayos se realizaron con las siguientes condiciones:

Tabla 18. Tratamiento experimental realizado para la microextracción en fase sólida de ambas materias vegetales

Materia vegetal	# de prueba	C pesada	Tiempo de agitación
<i>Alnus acuminata</i>	1	1.0 g	1 hora
	2	0.5 g	30 min.
<i>Heliopsis longipes</i>	1	1.0 g	30 min.
	2	0.5 g	20 min.

Los resultados obtenidos se muestran en las *Tablas 16 y 17* y en las *Figuras 30 y 31*.

Para la corteza de *A. acuminata* se detectaron 32 compuestos volátiles, de los cuales los mayoritarios son: 2-metil-3-hidroxi-2,4,4-trimetilpentil éster del ácido propanóico (17.96%), 1-metilen-1H-indeno (9.83%), decanal (9.64%), estragol (9.77%) y el 2-metil-2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metiletil) propiléster del ácido propanóico (9.13%).

En cuanto a la raíz de *Heliopsis longipes*, se detectaron 39 compuestos volátiles, de los cuales los más importantes son: camfeno (22.20%), isodieno (9.44%), 2,6,6-trimetil-biciclo[3.1.1] hept-2-eno (7.04%), d-limoneno (7.03%) y el *o*-cimeno (7.02%). En general se identificaron una gran cantidad de terpenos volátiles.

Para la cálculo del índice de Kovats de cada componente, previamente se realizó la inyección de una coelución de estándares de *n*-alcanos (C₈-C₂₄) para posteriormente analizar a la fase sólida. Una vez que se inyecta la fase sólida, se



lleva a cabo la separación selectiva de los compuestos que se van registrando por medio del cromatógrafo de gases, de acuerdo al número de átomos de carbono que contienen los mismos y con el tiempo de retención de cada componente con la fase móvil (helio). Después, con ayuda del software del equipo (*Chroma TOF*) se realizaron los cálculos pertinentes para obtener los índices de Kovats, para finalmente comparar este resultado con la base de datos NIST y en referencias bibliográficas.



9. CONCLUSIONES

- Mediante la realización de las pruebas analíticas de identidad y composición derivadas del presente trabajo, fue posible llevar a cabo el control de calidad de la corteza de *A. acuminata* como droga vegetal.
- Los compuestos marcadores identificados en los extractos hexánico, metanólico y clorofórmico a través de una CCF coincidieron con cuatro referencias trabajadas, estando presente en cantidades significativas: lup-20(29)-en-3,28-diol, β -sitosterol, 20(29)-lupen-3 β -ol y 14-taraxeren-3-ona
- La cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu y mediante la aplicación de la fórmula farmacopéica propuesta permitió comprobar que ambos métodos son factibles para la determinación de la concentración de fenoles totales en la planta.
- El extracto metanólico de la corteza de *A. acuminata* presentó gran actividad antioxidante.
- El método analítico para la extracción de compuestos volátiles de la corteza de *A. acuminata* y de la raíz medicinal *Heliopsis longipes* utilizando la técnica de microextracción en fase sólida (HS-SPME) es adecuado para la identificación de compuestos volátiles en ambas drogas vegetales.



10. PERSPECTIVAS

- Realizar la cuantificación de los compuestos marcadores identificados en los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico, considerados como estándares por medio de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE), así como la validación de esta cuantificación.
- Validar el método desarrollado para la cuantificación de fenoles totales por medio de la fórmula farmacopeica propuesta, esto para que pueda ser integrada en la monografía correspondiente a la corteza de *A. acuminata* como prueba de control de calidad con los datos que hasta el momento se tienen (pruebas de identidad, pureza, composición y actividad biológica).
- Comprobar la capacidad antioxidante de la raíz medicinal *H. longipes* con el fin de ampliar el conocimiento en la farmacología de esta planta natural.



11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, A. (1999), Plantas medicinales del Sur de México, México, Guías prácticas. México desconocido.

Aguilar, M.I., Rovelo, R., Verjan, J.G., Illescas, O., Baeza A.E., De la Fuente, M., Ávila, I., Navarrete, A. (2011), Antiinflammatory activities triterpenoids and diarylheptanoids of *Alnus acuminata* spp. *arguta*, *Pharmaceutical Biology*, **49**:1052-1057.

Álvarez, V.H. (1956), Estudio forestal del Jaúl *Alnus jorullensis* (HBK) en Costa Rica. Tesis Mag. Agr. Turrialba C.R., IICA. pp. 96.

Apak, R.; Guclu, K.; Demirata, B.; Ozyurek, M.; Celik, S. E.; Bektasoglu, B.; Berker, K.; Ozyurt, D. (2007) Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay, *Molecules*, **12**:1496-1547.

Argueta, A., Cano, A., Rodarte M.E. (1994), Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 3er vol., México D.F., Instituto Nacional Indigenista.

Bauer, R. (1998), Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drugs standards be achieve, *Drug Information Journal*. **32**:101-110.

Bauer, R., Tittel, G. (1996), Quality assessment of herbal preparations as precondition of pharmacological and clinical studies, *Phytomedicine*, **2**:193-198.

Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996), Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration, *Methods in Enzymology*, 16-17, 299.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995, Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity; *Lebensmittel Wissenschaft und Technologic*, 26.



Busse, W. (2000), *The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicine products*, Drug information Journal. **34**:15-23.

CATIE (Centro Agronomico Tropical de Investigación y Enseñanza), Costa Rica, 1986.

Chen, J., González-Laredo, R.F., Karchesy, J.J. (2000), *Minor diarylheptanoids glycosides of Alnus rubra bark*, Phytochemistry, **53**:971-973.

Cheng, Z.; Moore, J.; Yu, L. (2006) *High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, **54**:7429-7436.

CONABIO (2008). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Constant, M. (1997), *Headspace gas chromatography profiles of fruit flavored malt beverages using solid-phase microextraction*. J. Am. Soc. Brew. Chem., **55**:112-118.

Dornelles, M.L., Hernandez, M.G., Mascini, M., Tatsuo, K.L. (2006), *Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor*, Biosensors bioelectronics, **21**:1374-1382.

Duke, A.J. (1992), *Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS herbs and other economics plants*, Boca Raton, Florida, USA, CRC Press, pp. 123-456.

Evans, T. (1985), *Farmacognosia*, Ed. Interamericana McGraw-Hill, Barcelona, España, pp. 148.

Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2ª edición, Secretaria de Salud, México, 2013.

Fontquer (1962), *Plantas medicinales*, Ed. Labor, Barcelona, España, pp. 97.

Forlow, J.J., (1979), *The systematics of american species of Alnus Betulaceaes*, part I. Rhodora (EE.UU.) **81**:1-121.



Franz, G., Vlietinck, A. (2001), Results and methods of work of the European pharmacopoeiae. Proceedings of the International Symposium of Herbal Medicine Products: Quality Evaluation. Contribution of the European Pharmacopoeiae, Pharmaeuropa, # especial, 17-25.

García-Chávez, A., Ramírez, C.E. & Molina-Torres, J. (2004), El género *Heliopsis* (*Heliantheae*; *Asteraceae*) en México y las alcanidas presentes en sus raíces, Acta Botánica Mexicana, **69**:115-131.

Gorecki, T., Pawliszyn, J. (1996), Determination of tetrathylled and inorganic lead in water by solid phase microextraction/Gas chromatography, Analytical Chemistry, **68**:3008-3014.

Gutiérrez-Avella, D.M.; Ortiz-García, C.A.; Mendoza-Cisneros, A. (2008), Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal, Simposio de Metrología 2008, Universidad Autónoma de Querétaro.

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

Haining, G.S. (2011), Naturally occurring diarylheptanoids – A supplementary version, ACG publications, Rec. Nat. Prod. **6**: 321-333.

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

Harborne, B. (1991). Dictionary of Organic Compounds, 5a edición, Marcel Dekker, New York, pp. 276-320.

Harris, D.C. (2008), Análisis químico cuantitativo, 3ª Edición. Ed. Reverté. México, pp. **517-518**, 528-532.

Hernández, M. R., Gally-Jordá, M. (1981), Plantas medicinales, uso y dosificación de las 184 plantas más usadas en América latina, Ed. Árbol, México, pp.7.



<http://www.itis.gov>.

Iglesias-Neira, J. (2009), *Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca*, Tesis Doctoral, Universidad Santiago de Compostela.

Jin, W., Kai, X.F., Na, M., Lee, J.J., Bae, K. (2007), *Triterpenoids and diarylheptanoids from *Alnus hirsute* inhibit HIF-1 in AGS cells*, Archives of Pharmaceutical Research, **30**:412-418.

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

Kim, H.J., Yeom, S.H., Kim, M.K., Shim, J.G., Paek, I.N., Lee, M.W. (2005). *Nitric oxide and prostaglandin E2 synthesis inhibitory activities of diarylheptanoids from the barks of *Alnus japonica* Steudel*. Archives of Pharmaceutical Research **28**:177–179.

Kumar, S., Shukia, Y. (2003), *Herbal Medicine: current status and the future*, Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, **4**:281-288.

Kurihara, K. K.; Miyata, N., Suzuki, T., and Toyoda, M. (1999), *Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation*, Archives of Biochemistry and Biophysics, **362**:79-86.

Kuroyanagi, M, Shimomae, M., Nagashiwa, Y., Muto, N., Okuda, T., Kawahara, N., Nakane, N., Sano, T. (2005), *New Diarylheptanoids from *Alnus japonica* and their Antioxidative Activity*, Chem. Pharm. Bull. **53**:1519-1523.

Lazarowich, N.J., Pekos, P. (1998), *Use of fingerprinting and marker compounds for identification and standardization of botanical drugs: strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis to herbal products*, Drug Information Journal, **32**:493-512.



- Leong, L.P., Shui G. (2002), *An investigation of antioxidants capacity of fruits in Singapore markets*, Food Chemistry, 70.
- Linares, E., Flores, B., Bye, R. (1994), *Selección de plantas Medicinales de México*, México, Limusa.
- Lozoya, X. (1994), *Two decades of Mexican ethnobotany and research on plant derived In: Ethnobotany and the Search of New Drugs*, Ciba Foundation Symposium 185. New York: Wiley.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. (2004), *Polyphenols: food sources and bioavailability*, American Journal for Clinical Nutrition, **79**:727–47.
- Mañes, S., Recio, M.C. & Ríos, J.L. (1997), *Effects of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation*, European Journal of Pharmacology, **334**:103-105.
- Martí, M.P., Mestres, M., Sala, C., Bustos, O. & Guasch, J. (2003) *Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography Olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **51**:7861-7865.
- Martínez, J. (1984), *La flora de Veracruz*. Ed. El Ateneo, Fascículo # 20, Xalapa, Ver., México, 128-136.
- Martínez, M. (1959), *Las plantas medicinales de México*, Ediciones Bota, México, pp. 128.
- Martínez, M. (2005), *Las plantas medicinales de México*, Ediciones Botas, Tomo I, México, pp. 113-115.
- Martinez-Vazquez, M.; Gonzalez-Esquinca, A. R.; Cazares-Luna, L.; Moreno-Gutierrez, M. N.; Garcia-Argaez, A. N. (2004) *Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K.*, Journal of Ethnopharmacology, **66**:79–82.



Mata, R. (2000), Curso teórico de Farmacognosia, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Matsuda, H., Ishakado A., Nishida, N., Ninomiya, K., Fijiwara, H., Kobayashi, Y., Masayuki, Y. (1998), Hepatoprotective, Superoxide Scavenging, and Antioxidative Activities of Aromatic Constituents from the Bark of *Betula platyphylla* var. *japonica*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **8**:2939-2944.

Miyamoto, N.; Kuramoto, N., Yamada, H. (2002), Differences in spatial anticorrelation between four sub-populations of *Alnus trabeculosa* Hand.-Mazz (*Betulaceae*), Heredity, **89**:273-279.

Min-Won, L., Jung-Hwan, K., Dong-Wood, J., Kyoung-Hwan, A., Sang-Hak, T., Young-Jonh, S. (2000), Inhibition of Cyclooxygenase-2. Expression by Diarylheptanoid from the Bark of *Alnus hirsute* var. *sibirica*, Biological & Pharmaceutical Bulletin, **23**:517-518.

Mitchell, R.N., Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Fisiopatología Estructural. Compendio de Robbins y Cotran, 7a edición, Elsevier, España, 2007. Pp. 31-57.

Molina, J., Salazar, C., Armenta, C., Ramírez, E. (2004), Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduced amides, Journal of Agriculture and Food Chemistry. **52**:4700-4704.

Molina-Torres, J., García-Chávez, A. (2001), Alcamidas en plantas: distribución e importancia, Avance y Perspectiva, **20**:377-387.

Moon, J., Shibamoto, T. (2009), Antioxidant Assays for Plant and Food Components, Journal of Agricultural Chemistry, **57**(5):1655-1666.

Navarrete, A., Mata, R. (2009); Monografía científicas de plantas medicinales de México. Cuachalalate; Ed. Sentido Giratorio, México, pp. 17.

Navarrete, A., Mata, R.; Plantas medicinales de México. Monografía científica. Pruebas de control de calidad (identidad y composición), eficacia y seguridad de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*); Ed. Sentido Giratorio, México, 2009.



- Pathwardhan, B., Gautam, M. (2005), *Botanical Immunodrugs and Opportunities*. Drugs Discovery Today. **10**:495-501.
- Pawliszyn, J. (1997), *Solid phase microextraction, theory and practice*, Wiley-VCH, New York, EUA.
- Prochazkova, D.; Bousova, I.; Wilhelmova, N. (2011) *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids*, Fitoterapia, **82**:513–523.
- Osuna-Torres, L., Tapia-Pérez, M. (2005), *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales*, Ed. Universidad Barcelona, pp. 9.
- Ou, B.; Prior, R. L.; Huang, D. (2005) *The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, **53**:1841-1856.
- Peres V., Tanus J., Faustino de Oliveira F. (2000), *Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes*, Phytochemistry, **55**:683-710.
- Peterson, D.G., *Patent application publication*, Feb. 10, 2005. Pub. núm. US 2005/0031771 A1.
- Phillipson, J., (2011), *Phytochemistry and medicinal plants*, Phytochemistry, **56**:237-242.
- Plotkin, M., (2001), *Global Phytochemistry: the ethnobotanist view*, Phytochemistry, **56**:117-120.
- Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. (2005), *Standardized Methods for the Determination of Antioxidants Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, **53**:4290-4302.
- Prochazkova, D.; Bousova, I.; Wilhelmova, N. (2011), *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids*, Fitoterapia, **82**:513–523.



Quinones, M.; Miguel, M.; Aleixandre, A. (2012), Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular, Nutrición Hospitalaria, **27**(1):76-89.

Ríos, L.G. (2007), Control de calidad de una droga de origen vegetal: Iostephane heterophylla (Cav.) Hemsli. Tesis de maestría (Maestría en Ciencias Químicas, Facultad de Química, UNAM, México, D.F.

Rojas-Alba, M. (2010), Herbolaria y Medicina Tradicional Mexicana, Diplomado de Tlahui-Educa, Xalapa, Ver., México, 17 de Julio de 2010.

Roginsky, R.V.; Lissi, E. A. (2005), Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food, Food Chemistry, **92**:235-254. 2005.

Rubinson, J.; Rubinson, N. (2000), Análisis instrumental. Ed. Prentice Hall. Madrid, pp. 782.

Rzedowski, J., Rzedowsky, G.C. (2001), Flora fanerogámica del Valle de México; 2ª edición, Instituto de Ecología A.C., México, pp. 622-624.

Sarka, K.S. & Howard, R.E. (1976), Specificity of the vanillin test for flavanols, Journal of Food and Agricultural Chemistry **24**(2):317-320.

Simplicio, A. L., Boas, L.V. (1999), Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice, Journal of Chromatography A., **833**:35-42.

Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R.M. (1999), Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, Methods in Enzymology, **299**:152-178.

Skoog, D.A., Holler, J., Crouch, S.R. (2008), Principios de Análisis Instrumental, 6a.Edición. Cengage Learning. México, pp. **788-800**:806-808.

Song, J., Fan, L., Beaudry, R.M. (1998), Application of solid-phase microextraction and gaschromatography/time-of-flight mass spectrometry for rapid analysis of



flavorvolatiles in tomato and strawberry fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **46**:3721-3726.

Taga, M. S., Miller, E. E., & Pratt, D. E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidant. Journal of American Oil Chemists Society, 929.

Thimothy, F., Chaomei, M., Mohsen, D. (2004), Medicinal plants and herbs of Newfoundland and part 1. Chemical constituents of aerial part of pineapple weed (Matricaria matricaroides), DARU, **12**:131-135.

Tori, M., Kasushi, H., Yoshinori, A. (1995), Diarylheptanoids, Flavonoids, Stilbenoids, Sesquiterpenoids and Phenanthrene from Alnus maximowiczii, Phytochemistry, **40**(4):1263-1264.

Tyler, E.V. (1979), Farmacognosia, Librería el Ateneo, Buenos Aires, Argentina, pp. 406-415.

Ulrich, S., Martens, J. (2000), Solid-phase microextraction with capillary gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus selective method for the assay of antidepressant drug in human plasma. Journal of Chromatography B., **696**:217-234.

Venereo-Gutierrez, J. R. (2002), Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes, Revista Cubana Medicina Militar, **31**(2):126-33.

Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G., Fu, Y.J. (2008) Antioxidative activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to its main components, Food Chemistry, **108**:1019–1022.

Walter, F. (2005), The pathophysiology of acute pain, Emergency Medicine Clinics of North America, **23**:277-284.

Wernerowska, G.; Gaca, J., (2008), Application of Headspace Solid-Phase Microextraction for Determination of Chloro-Organic Compounds in Sewage Samples. Toxicology Mechanisms and Methods, **18**:543-550.



Yadav, D., Singh, S.C., Verma, R.K., Richa, K.S., Kalpana, P., Mohan, M., (2013), *Antifilarial diarylheptanoids from Alnus nepalensis leaves growing in high altitude areas of Uttarakhand, India;* *Phytomedicine* **20**:124–132.

**ANEXO I.**

Absorbancias obtenidas de las curvas de calibración realizadas con ácido gálico a diferentes concentraciones (ver *Gráfico 1, 2 y 3*)

Tabla 19. Resultados de la primera curva de calibración de ácido gálico.

Conc. ácido gálico [µg/mL]	Abs (λ = 700 nm) Réplica I	Abs (λ = 700 nm) Réplica II	Abs (λ = 700 nm) Réplica III	Abs (λ = 700 nm) Réplica IIII
0	0.053	0.059	0.051	0.045
1.33	0.046	0.073	0.06	0.063
6.64	0.059	0.096	0.07	0.047
16.59	0.088	0.13	0.13	0.095
41.47	0.16	0.201	0.189	0.196
69.12	0.391	0.324	0.297	0.26
115.2	0.431	0.443	0.44	0.496
192	0.553	0.854	0.853	0.814
320	1.645	1.522	1.665	1.482
400	1.084	1.71	0.693	1.502
500	1.35	2.025	2.258	2.409

Tabla 20. Resultados de la segunda curva de calibración de ácido gálico.

Conc. ácido gálico [µg/mL]	Abs (λ = 700 nm) Réplica I	Abs (λ = 700 nm) Réplica II	Abs (λ = 700 nm) Réplica III	Abs (λ = 700 nm) Réplica IIII
0	0.053	0.059	0.051	0.045
2.65	0.056	0.047	0.05	0.07
13.27	0.147	0.118	0.144	0.093
33.18	0.142	0.18	0.181	0.166
55.30	0.308	0.284	0.254	0.279
92.16	0.337	0.382	0.422	0.446
115.2	0.635	0.637	0.601	0.607
144	0.361	0.295	0.331	0.631
180	1.074	1.062	0.986	1.059
300	1.211	1.29	1.123	0.7
500	2.601	2.473	2.467	2.043

Tabla 21. Resultados de la tercera curva de calibración de ácido gálico.

Conc. ácido gálico [µg/mL]	Abs (λ = 700 nm) Réplica I	Abs (λ = 700 nm) Réplica II	Abs (λ = 700 nm) Réplica III	Abs (λ = 700 nm) Réplica IIII
0	0.051	0.045	0.046	0.045
3.54	0.064	0.057	0.063	0.059
17.69	0.101	0.124	0.116	0.132
44.24	0.176	0.218	0.256	0.268
73.73	0.227	0.302	0.288	0.355
122.88	0.488	0.464	0.672	0.622
153.6	0.435	0.629	0.671	0.801
192	0.475	0.766	0.81	0.975
240	0.727	0.941	0.919	1.135
400	1.279	1.494	1.815	1.823
500	1.96	2.243	2.315	2.47



ANEXO II

ANEXO II (a)

Análisis de varianza de las diferentes curvas de calibración

De la **primera curva de calibración**, y conjuntando todos los datos de absorbancia de las 4 réplicas, se obtuvo la siguiente gráfica con la ecuación lineal corregida (por pronóstico de las ordenadas) y el correspondiente gráfico de residuales:

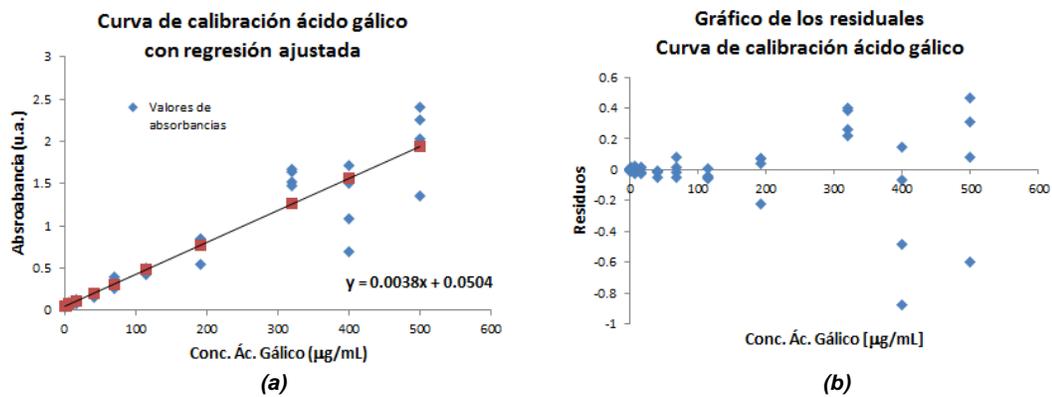


Gráfico 1 y 2. Representación gráfica de la primera curva de calibración de ácido gálico ajustada (a); gráfico de residuales (b)

Del análisis de ecuación lineal, se obtuvo lo siguiente:

Tabla 22 y 23. Estadísticas de la regresión ajustada de la primera curva de calibración

Coefficiente de correlación múltiple	0.94467907
Coefficiente de determinación R ²	0.89241854
R ² ajustado	0.88985708
Error típico	0.22898749
Observaciones	44

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0.05041074	0.04618166	1.09157479	0.28124249	-0.04278763	0.14360911	-0.04278763	0.14360911
Variable X 1	0.00378892	0.00020299	18.6655256	5.9945E-22	0.00337927	0.00419857	0.00337927	0.00419857



Una vez realizado el análisis de varianza de todos los valores de absorbancias y concentraciones de ácido gálico, se obtuvo lo siguiente:

Tabla 24. Análisis de varianza de los datos de absorbancia y concentración de ácido gálico conocidas

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	18.2685447	18.2685447	348.401847	5.9945E-22
Residuos	42	2.20228131	0.05243527		
Total	43	20.470826			

De la **segunda curva de calibración**, y conjuntando todos los datos de absorbancia de las 4 réplicas, se obtuvo la siguiente gráfica con la ecuación lineal corregida (por pronóstico de las ordenadas) y el correspondiente gráfico de residuales:

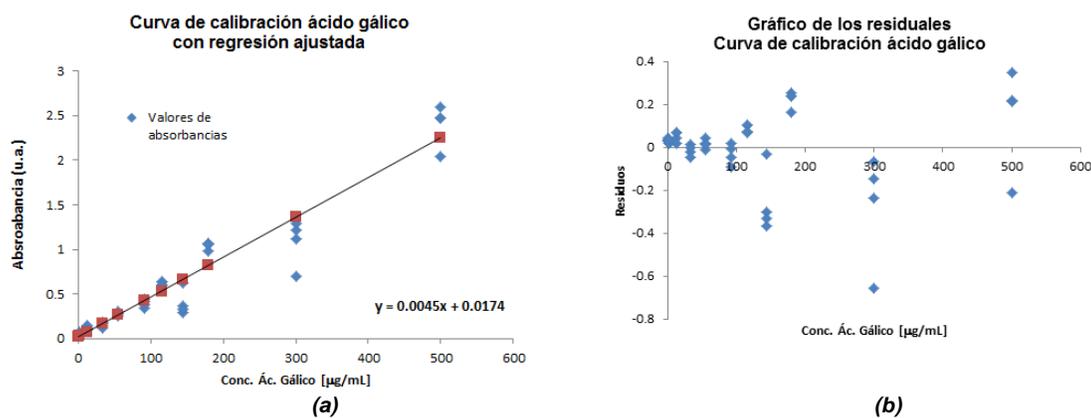


Gráfico 3 y 4. Representación gráfica de la segunda curva de calibración de ácido gálico ajustada (a); gráfico de residuales (b)

Del análisis de ecuación lineal, se obtuvo lo siguiente:

Tabla 25 y 26. Estadísticas de la regresión ajustada de la segunda curva de calibración

Coefficiente de correlación múltiple	0.964687
Coefficiente de determinación R ²	0.930621
R ² ajustado	0.92896912
Error típico	0.18136151
Observaciones	44



	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0.0174343	0.03676676	0.47418631	0.63782312	-0.05676404	0.09163263	-0.05676404	0.09163263
Variable X 1	0.00447009	0.00018833	23.7354277	5.8668E-26	0.00409003	0.00485016	0.00409003	0.00485016

Una vez realizado el análisis de varianza de todos los valores de absorbancias y concentraciones de ácido gálico, se obtuvo lo siguiente:

Tabla 27. Análisis de varianza de los datos de absorbancia y concentración de ácido gálico conocidas

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	18.5303825	18.5303825	563.370529	5.8668E-26
Residuos	42	1.38146393	0.032892		
Total	43	19.9118464			

De la **tercera curva de calibración**, y conjuntando todos los datos de absorbancia de las 4 réplicas, se obtuvo la siguiente gráfica con la ecuación lineal corregida (por pronóstico de las ordenadas) y el correspondiente gráfico de residuales:

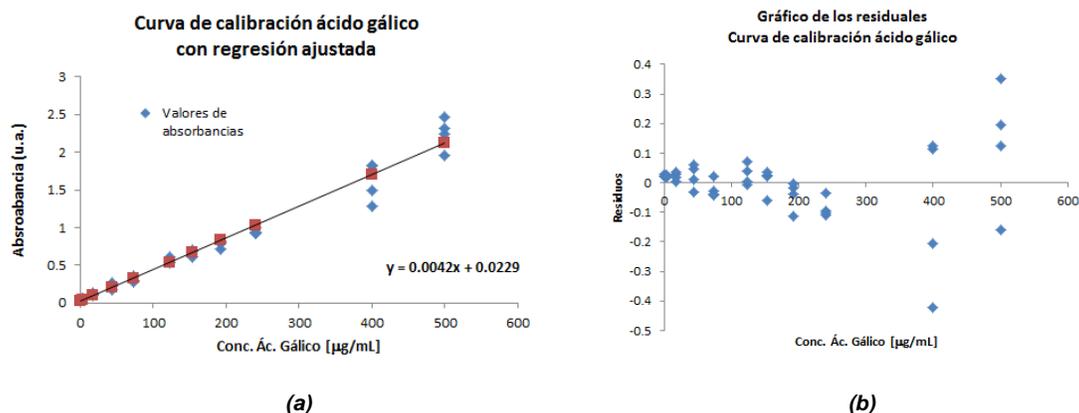


Gráfico 5 y 6. Representación gráfica de la tercera curva de calibración de ácido gálico ajustada (a); gráfico de residuales (b)

Del análisis de ecuación lineal, se obtuvo lo siguiente:

**Tabla 28 y 29.** Estadísticas de la regresión ajustada de la tercera curva de calibración

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.98649378
Coefficiente de determinación R ²	0.97316998
R ² ajustado	0.97253117
Error típico	0.11228067
Observaciones	44

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	0.02287862	0.02403597	0.95184923	0.34661936	-0.02562793	0.07138517	-0.02562793	0.07138517
Variable X 1	0.00419218	0.00010741	39.0308942	1.2428E-34	0.00397543	0.00440894	0.00397543	0.00440894

Una vez realizado el análisis de varianza de todos los valores de absorbancias y las concentraciones de ácido gálico, se obtuvo lo siguiente:

Tabla 30. Análisis de varianza de los datos de absorbancia y concentración de ácido gálico conocidas

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	19.2055609	19.2055609	1523.4107	1.2428E-34
Residuos	42	0.52949186	0.01260695		
Total	43	19.7350528			



ANEXO II (b)

De los datos eliminados de la **tercera curva de calibración**, y conjuntando todos los datos de absorbancia de las 4 réplicas, se obtuvo la siguiente gráfica con la ecuación lineal corregida (por pronóstico de las ordenadas) y el correspondiente gráfico de residuales:

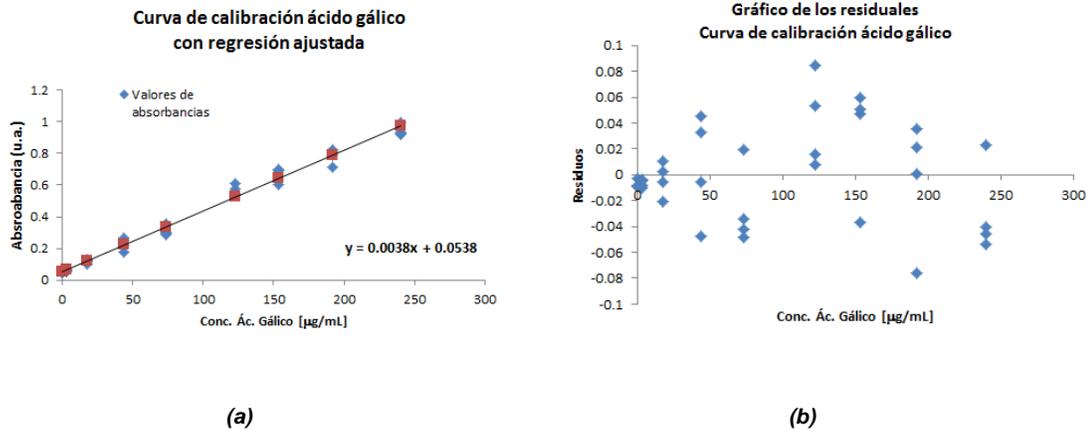


Gráfico 7 y 8. Representación gráfica de la curva de calibración de ácido gálico ajustada (a); gráfico de residuales (b)

Del análisis de ecuación lineal, se obtuvo lo siguiente:

Tabla 31 y 32. Estadísticas de la regresión ajustada de la tercera curva de calibración

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.99358043
Coefficiente de determinación R ²	0.98720207
R ² ajustado	0.98682566
Error típico	0.03692314
Observaciones	36

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0.05383143	0.00934921	5.75786017	1.777E-06	0.03483155	0.07283131	0.03483155	0.07283131
Variable X 1	0.00382694	7.4727E-05	51.2120988	9.0579E-34	0.00367508	0.00397881	0.00367508	0.00397881

Una vez realizado el análisis de varianza de todos los valores de absorbancias y las concentraciones de ácido gálico, se obtuvo lo siguiente:



Tabla 33. Análisis de varianza de los datos de absorbancia y concentración de ácido gálico conocidas

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	3.5755464	3.5755464	2622.67906	9.0579E-34
Residuos	34	0.04635282	0.00136332		
Total	35	3.62189922			



ANEXO III

Análisis de varianza de las diferentes curvas de calibración realizadas para las pruebas antioxidantes

ANEXO III (a)

Análisis de varianza de las curvas de calibración del ensayo DPPH (Trolox):

Conjuntando los datos de absorbancia de las 3 réplicas de la curva de calibración con Trolox en el ensayo de DPPH, se obtuvo la siguiente gráfica con la ecuación lineal corregida (por pronóstico de las ordenadas) y el correspondiente gráfico de residuales:

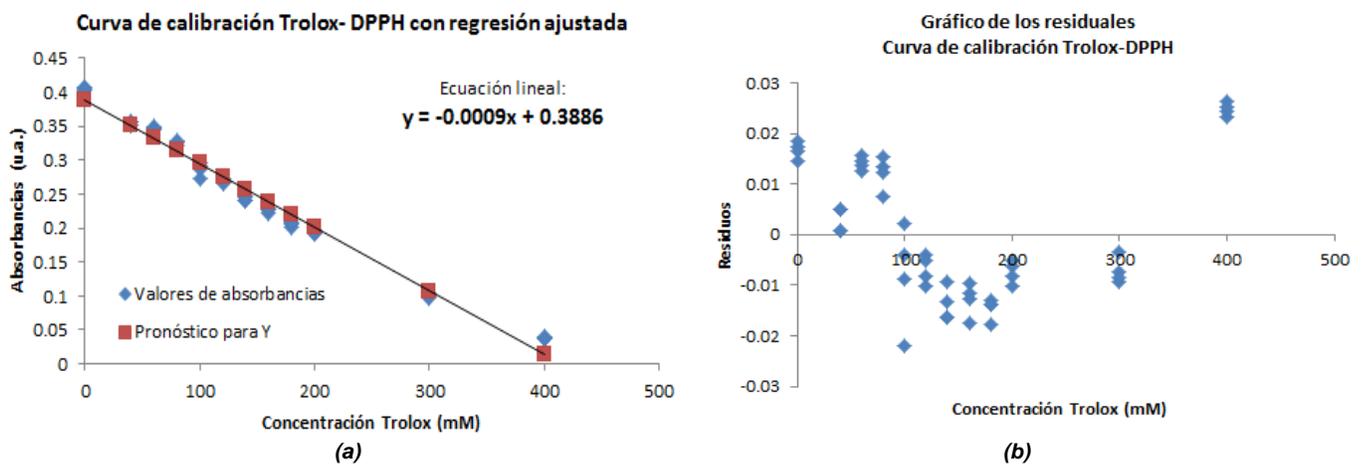


Gráfico 9 y 10. Representación gráfica de la curva de calibración de Trolox (a); gráfico de residuales (b) para el ensayo de DPPH.

Del análisis de ecuación lineal, se obtuvo lo siguiente:

Tabla 34 y 35. Estadísticas de la regresión ajustada de la tercera curva de calibración

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.99126078
Coefficiente de determinación R ²	0.98259794
R ² ajustado	0.98221963
Error típico	0.01374076
Observaciones	48



	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	0.38856741	0.00337268	115.210324	2.8131E-58	0.38177856	0.39535626	0.38177856	0.39535626
Variable X 1	-0.00093725	1.839E-05	-50.9643457	4.0334E-42	-0.00097427	-0.00090023	-0.00097427	-0.00090023

Una vez realizado el análisis de varianza de todos los valores de absorbancias y las concentraciones de Trolox, se obtuvo lo siguiente:

Tabla 36. Análisis de varianza de los datos de absorbancia y concentración de Trolox conocidas

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0.49040472	0.49040472	2597.36454	4.0334E-42
Residuos	46	0.00868519	0.00018881		
Total	47	0.49908992			



ANEXO III (b)

Análisis de varianza de las curvas de calibración del ensayo ABTS (Trolox):

Conjuntando los datos de absorbancia de las 3 réplicas de la curva de calibración con Trolox en el ensayo de ABTS, se obtuvo la siguiente gráfica con la ecuación lineal corregida (por pronóstico de las ordenadas) y el correspondiente gráfico de residuales:

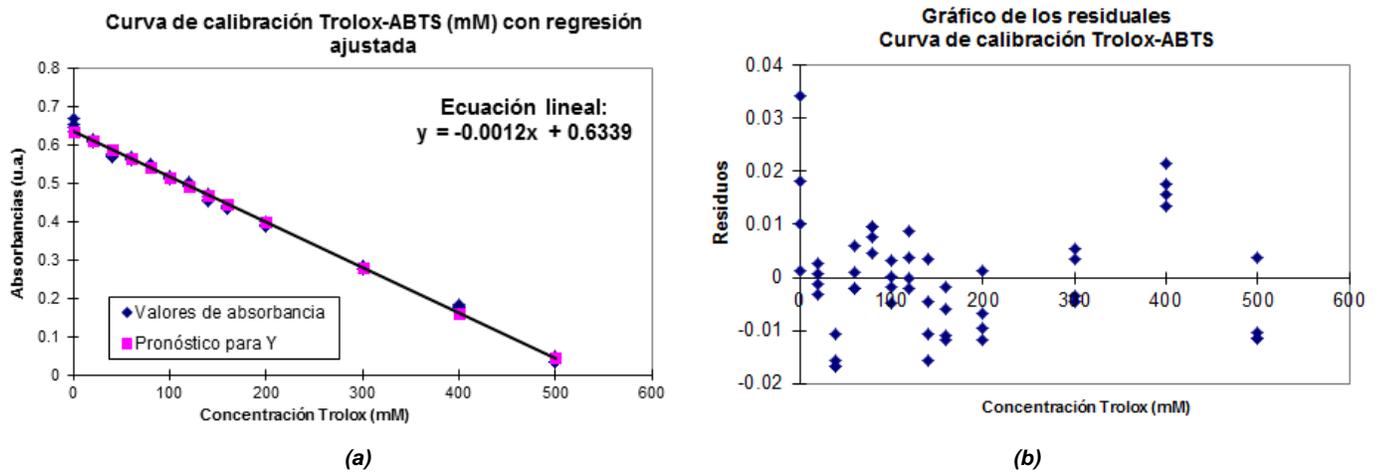


Gráfico 11 y 12. Representación gráfica de la curva de calibración de Trolox (a); gráfico de residuales (b) para el ensayo del ABTS

Del análisis de ecuación lineal, se obtuvo lo siguiente:

Tabla 37 y 38. Estadísticas de la regresión ajustada de la tercera curva de calibración

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.99819215
Coefficiente de determinación R ²	0.99638757
R ² ajustado	0.99631532
Error típico	0.01056441
Observaciones	52

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0.63386611	0.00219908	288.241326	3.3909E-82	0.62944912	0.63828309	0.62944912	0.63828309
Variable X 1	-0.00118102	1.0057E-05	-117.435465	9.9091E-63	-0.00120122	-0.00116082	-0.00120122	-0.00116082

Una vez realizado el análisis de varianza de todos los valores de absorbancias y las concentraciones de Trolox, se obtuvo lo siguiente:



Tabla 39. Análisis de varianza de los datos de absorbancia y concentración de Trolox conocidas

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1.5391779	1.5391779	13791.0884	9.9091E-63
Residuos	50	0.00558034	0.00011161		
Total	51	1.54475823			

ANEXO III (c)

Análisis de varianza de las curvas de calibración del ensayo FRAP (Ácido Ascórbico y Trolox):

Ácido ascórbico

Conjuntando los datos de absorbancia de las 3 réplicas de ambas curvas de calibración con ácido ascórbico en el ensayo de FRAP, se obtuvieron las siguientes gráficas con sus correspondientes ecuaciones lineales corregidas (por pronóstico de las ordenadas) y el correspondiente gráfico de residuales:

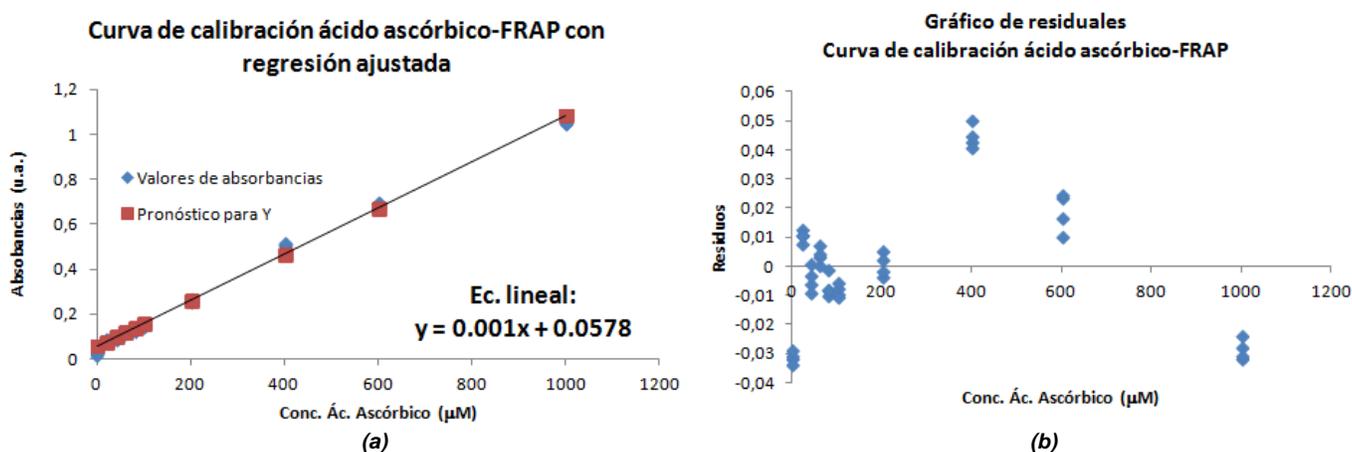


Gráfico 13 y 14. Representación gráfica de la curva de calibración de ácido ascórbico (a); gráfico de residuales (b) para el ensayo de FRAP.



Del análisis de ecuación lineal, se obtuvo lo siguiente:

Tabla 40 y 41. Estadísticas de la regresión ajustada de la curva de calibración de ácido ascórbico ajustada

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99777648
Coefficiente de determinación R ²	0,9955579
R ² ajustado	0,99544101
Error típico	0,02178878
Observaciones	40

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	0,05781818	0,00442945	13,0531203	1,2823E-15	0,04885122	0,06678514	0,04885122	0,06678514
Variable X 1	0,00102773	1,1136E-05	92,2849818	2,5959E-46	0,00100518	0,00105027	0,00100518	0,00105027

Una vez realizado el análisis de varianza de todos los valores de absorbancias y las concentraciones de ácido ascórbico, se obtuvo lo siguiente:

Tabla 42. Análisis de varianza de los datos de absorbancia y concentración de ácido ascórbico conocidas

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	4,04322297	4,04322297	8516,51787	2,5959E-46
Residuos	38	0,01804053	0,00047475		
Total	39	4,0612635			

Trolox

Conjuntando los datos de absorbancia de las 3 réplicas de ambas curvas de calibración con Trolox en el ensayo de FRAP, se obtuvieron las siguientes gráficas con sus correspondientes ecuaciones lineales corregidas (por pronóstico de las ordenadas) y el correspondiente gráfico de residuales:

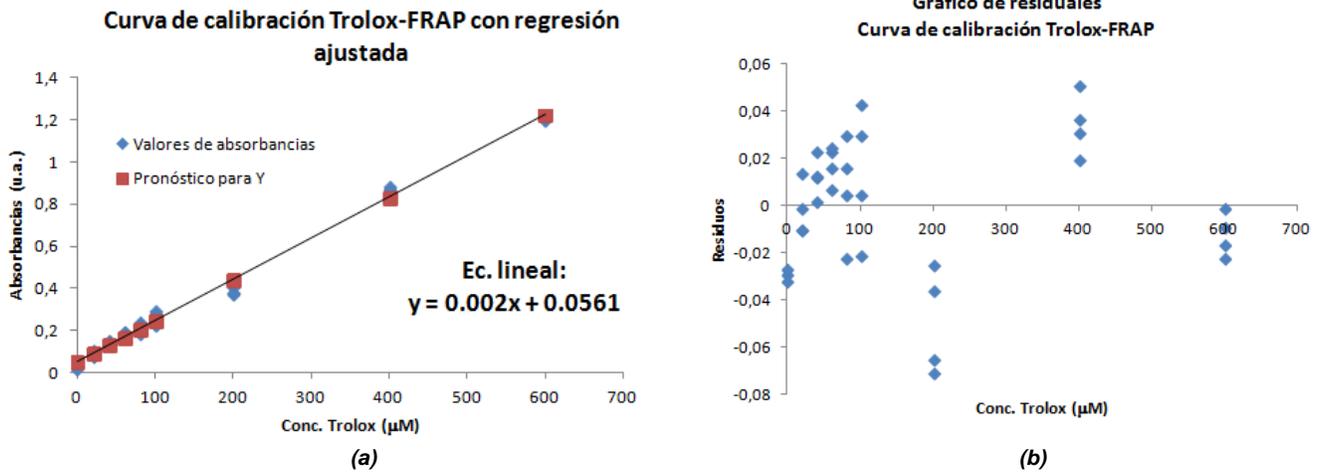


Gráfico 15 y 16. Representación gráfica de la curva de calibración de Trolox (a); gráfico de residuales (b) para el ensayo de FRAP.

Del análisis de ecuación lineal, se obtuvo lo siguiente:

Tabla 43 y 44. Estadísticas de la regresión ajustada de la curva de calibración de Trolox ajustada

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9972284
Coefficiente de determinación R ²	0,99446448
R ² ajustado	0,99429674
Error típico	0,02887526
Observaciones	35

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0,05610396	0,00653292	8,58788588	6,3327E-10	0,04281264	0,06939528	0,04281264	0,06939528
Variable X 1	0,00195039	2,5331E-05	76,996767	7,9917E-39	0,00189886	0,00200193	0,00189886	0,00200193

Una vez realizado el análisis de varianza de todos los valores de absorbancias y las concentraciones de ácido ascórbico, se obtuvo lo siguiente:



Tabla 45. Análisis de varianza de los datos de absorbancia y concentración de Trolox conocidas

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	4,94307192	4,94307192	5928,50212	7,9917E-39
Residuos	33	0,02751477	0,00083378		
Total	34	4,97058669			