



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

FACULTAD DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGÍA



Estudio de las propiedades antioxidantes y toxicológicas de extractos polifenólicos de cortezas de especies mexicanas pertenecientes al género *Quercus*.

TESIS

Para obtener el título de
Química Farmacobióloga.

Presenta:

PQFB. María Cristina Martínez García

Directora:

D.C. Martha Estrella García Pérez

Morelia, Michoacán, México. Diciembre 2016

Dedicatoria:

Esta investigación es dedicada a mi familia, por todo el apoyo incondicional que me han brindado para cumplir las metas que me he propuesto.

A mis padres, por ese esfuerzo y apoyo constante, porque a pesar de mis errores han vuelto a confiar en mí, dándome herramientas para superarme.

A mi hermano, mi compañero que sin juzgar ni criticar, siempre estas cerca de mí y al pendiente de mis planes.

Dedicada especialmente a mi hijo Kevin, mi compañero y maestro de vida. Porque siendo tan pequeño, me has demostrado que se puede ir más allá de las expectativas. Que somos nosotros mismos quienes decidimos las limitantes de nuestras capacidades. Porque tu inocencia llena de alegría mis días. Por ser mi fortaleza, el motivo para ser mejor persona y la razón perfecta para creer en Dios. Te dedico este y todos mis logros porque te amo infinitamente.

Agradecimientos:

A mi asesora DC Martha Estrella García Pérez a quien quiero y admiro. Gracias por creer en mí, por estar siempre pendiente de mi trabajo y de mi persona. Gracias por su apoyo y dedicación, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de investigación, pero sobre todo, gracias por ser un ejemplo e inspiración como persona y como profesionalista.

Al DC Héctor Martínez por permitirme desarrollar la investigación en el Laboratorio de Investigación de Alimentos de la Facultad de Químico Farmacología, así como a la DC Carmen Bartolomé Camacho por la ayuda brindada en la realización de los estudios en *Artemia franciscana*.

A la MC Eréndira Valencia Avilés, gracias por la paciencia y los conocimientos brindados, por permitirme ser parte de su proyecto.

A todos los Profesores que han sido parte de mi crecimiento profesional, a los Químicos que han compartido su conocimiento.

A mis sinodales, por tomarse el tiempo para evaluar esta investigación. Gracias por su dedicación e interés.

A mis padres Rita García y Rafael Martínez. Gracias por apoyarme para cumplir mis metas, por hacer lo posible para darme lo que ha estado en sus posibilidades para que, con mi esfuerzo, logre lo que hasta ahora.

A mi familia, especialmente a mi querida abuela Refugio Vargas y a mis tías Teresita y Rosa Martínez. Gracias por el apoyo, cariño, confianza e inspiración, gracias porque con sus palabras y su presencia me dan la fortaleza para seguir superándome.

A Erick Reyes, porque las constantes exigencias me ayudaron a lograr esta meta. A mis amigos, especialmente a Cristian Pérez. Gracias por coincidir, por ser parte de mi vida, porque sé que a pesar de la distancia, siempre puedo contar con ustedes.

A mi hijo Kevin Jared Martínez. Gracias por ser mi motivo de superación.

Título: Estudio de las propiedades antioxidantes y toxicológicas de extractos polifenólicos de cortezas de especies mexicanas pertenecientes al género Quercus.

ÍNDICE

Glosario:.....	1
Resumen:.....	3
Abstract:.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS Y SU IMPORTANCIA PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS MEDICAMENTOS	7
2.2 LOS POLIFENOLES	9
2.2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS POLIFENOLES	9
2.2.2 METODOS DE EXTRACCIÓN	13
2.2.3 IMPORTANCIA DE LOS POLIFENOLES COMO AGENTES ANTIOXIDANTES.....	15
2.2.4 LOS POLIFENOLES EN EL GENERO <i>QUERCUS</i>	17
2.2.5 UTILIZACIÓN MEDICINAL DE POLIFENOLES DEL GÉNERO <i>QUERCUS</i>	18
2.3 LA PSORIASIS	20
2.3.1 TIPOS DE PSORIASIS.....	22
2.3.1.1 Psoriasis en placas:.....	23
2.3.1.2 Otros tipos de psoriasis:	25
2.3.2 NIVELES DE GRAVEDAD	32
2.3.3 ESTRÉS OXIDATIVO Y PSORIASIS	33
2.3.4 TRATAMIENTOS ANTIPSORIASICOS ACTUALES.....	34
2.3.5 POLIFENOLES ESTUDIADOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA PSORIASIS	36
2.4 IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS TOXICOLOGICOS PRECLÍNICOS EN EL DESARROLLO FARMACEUTICO.....	36
2.4.1 ESTUDIOS DE TOXICIDAD AGUDA	37
2.4.2 ESTUDIOS DE TOXICIDAD A DOSIS REPETIDA.....	38
2.4.3 ESTUDIOS ALTERNATIVOS DE TOXICIDAD.....	39
2.4.4 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS REALIZADOS A POLIFENOLES DEL GÉNERO <i>QUERCUS</i>	43

3. JUSTIFICACIÓN.....	44
4. HIPÓTESIS	45
5. OBJETIVO GENERAL.....	45
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
7. METODOLOGÍA.....	46
7.1 COLECTA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LAS CORTEZAS.....	46
7.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS BRUTOS	46
7.2.1 EXTRACCIÓN POR maceración	46
7.2.2 Extracción al agua caliente	46
7.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA PRELIMINAR.....	46
7.3.1 Contenido de fenoles totales	47
7.3.2 Contenido de flavonoides totales.....	47
7.3.3 Contenido de ácidos hidroxicinámicos.....	47
7.3.4 Contenido de proantocianidinas	47
7.4 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS EXTRACTOS BRUTOS.....	48
7.4.1 Capacidad de atrapar radicales peróxido ($\text{ROO}\cdot$).....	48
7.4.2 Capacidad para eliminar el anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$)	48
7.4.3 Capacidad para eliminar el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$)	49
7.4.4 Capacidad para eliminar peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	49
7.4.5 Capacidad para eliminar el óxido nítrico	50
7.4.6 Capacidad para eliminar el ácido hipocloroso	51
7.5 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO BRUTO MÁS PROMETEDOR, RE- CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ESTUDIO DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	51
7.6 ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA EN ARTEMIA FRANCISCANA	52
7.6.1 Material biológico.....	52
7.6.2 Determinación de mortalidad en Artemia franciscana.....	52
8. RESULTADOS	53
8.1 Colecta e identificación botánica de las cortezas.....	53
8.2 Obtención de los extractos brutos.....	54
8.3 Caracterización química.....	54
8.4 Determinación de las propiedades antioxidantes.....	55
8.5 Purificación del extracto bruto más prometedor, re-caracterización química y estudio de capacidad antioxidante.....	57

8.6 Estudio de la toxicidad aguda en artemia franciscana	59
9. DISCUSIÓN	61
10. CONCLUSIÓN	64
11. RECOMENDACIONES	65
Bibliografía	66

Índice de tablas:

Tabla 1. Usos medicinales de los encinos del estado de Michoacán. (Uribe Salas & Chávez Carbajal, 2016).....	20
Tabla 2. Métodos alternativos aceptados internacionalmente para la valoración de la toxicidad.	40
Tabla 3. Categorías de peligro para sustancias peligrosas para el medio ambiente acuático – Toxicidad Aguda.	42
Tabla 4. Nombre común de encinos y especies identificadas.	53
Tabla 5. Caracterización química de los extractos de los encinos del género <i>Quercus</i>	55
Tabla 6. Capacidad antioxidante de los extractos del género <i>Quercus</i>	56
Tabla 7. Capacidad antioxidante comparativa de los extractos polifenólicos obtenidos a partir de especies mexicanas pertenecientes al género <i>Quercus</i>	57
Tabla 8. Rendimiento de extracción del extracto purificado de <i>Q. crassifolia</i>	57
Tabla 9. Contenido de fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxycinámicos y proantocianidinas del extracto de <i>Q. crassifolia</i> purificado y bruto.	58
Tabla 10. Actividad antioxidante del extracto purificado de <i>Q. crassifolia</i>	59

Índice de ilustraciones:

Ilustración 1. Ejemplos de fenoles simples.....	10
Ilustración 2. Estructura de los lignanos.....	11
Ilustración 3. Familia de los flavonoides.....	12
Ilustración 4. Una hipótesis etiopatogénica de la psoriasis. <i>Tomado de Díaz Murillo., 2016.</i>	22
Ilustración 5. Psoriasis en placas. <i>Tomada de:</i> <i>http://emedicine.medscape.com/article/1108072-overview</i>	23
Ilustración 6. Psoriasis de uñas. <i>Langley, et al., 2005.</i>	25
Ilustración 7. Psoriasis palmo-plantar. <i>Langley, et al., 2005.</i>	25
Ilustración 8. Cortezas recolectadas en C. Hidalgo, Michoacán, utilizadas en la presente investigación.....	53
Ilustración 9. Rendimientos de extracción con relación a la masa de cortezas de encinos (<i>Quercus sp</i>) por el método de extracción al agua caliente y extracción por maceración (etanol/agua 90/10 v/v).	54
Ilustración 10. Gráfica del Contenido de fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxycinámicos y proantocianidinas de los extractos de <i>Q. crassifolia</i> crudo y purificado.....	58
Ilustración 11. Morfología de los nauplios de <i>Artemia franciscana</i> , luego de la exposición a 24, 48 y 72 h con el extracto purificado de <i>Quercus crassifolia</i>	60

GLOSARIO:

- ♦ **Alcaloide:** Sustancia nitrogenada que se encuentra en ciertos vegetales y constituye un estimulante natural; puede ser venenosa y algunas se emplean en terapéutica médica.
- ♦ **Antimutagénico:** Fármaco que reduce la frecuencia o la tasa de mutaciones espontáneas o inducidas, independientemente del mecanismo implicado.
- ♦ **Antiséptico:** Sustancia que se emplea para destruir gérmenes.
- ♦ **Astringente:** Sustancia que produce constricción y sequedad en los tejidos orgánicos, disminuyendo la secreción de los mismos.
- ♦ **Aterosclerosis:** Síndrome caracterizado por el depósito e infiltración de sustancias lipídicas en la capa íntima de las paredes de las arterias.
- ♦ **Carcinogénesis:** Conjunto de fenómenos que determinan la aparición y desarrollo de un cáncer.
- ♦ **Centro estereogénico / Centro quiral:** Átomo que tiene cuatro átomos o grupos no equivalentes unidos a él. Anteriormente los centros estereogénicos se han llamado centros asimétricos o centros quirales.
- ♦ **Citosol:** es el líquido que se localiza dentro de las células. Constituye la mayoría del fluido intracelular.
- ♦ **Diana farmacológica:** lugar del organismo donde un fármaco ejerce su acción.
- ♦ **Difusión:** es un proceso físico irreversible, en el que partículas materiales se introducen en un medio que inicialmente estaba ausente, aumentando la entropía (desorden molecular) del sistema conjunto formado por las partículas difundidas o soluto y el medio donde se difunden o disuelven.
- ♦ **Disentería:** Enfermedad infecciosa que se caracteriza por la inflamación y ulceración del intestino grueso acompañada de fiebre, dolor abdominal y diarrea con deposiciones de mucosidades y sangre.
- ♦ **Empírico:** Que está basado en la experiencia, en la percepción y observación de los hechos.
- ♦ **Enzima:** Proteína que cataliza reacciones bioquímicas del metabolismo.
- ♦ **Extracto:** Sustancia muy concentrada que se obtiene de una planta, semilla u otra cosa por diversos procedimientos.
- ♦ **Fluido supercrítico:** Es cualquier sustancia que se encuentre en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico que se comporta como “un híbrido entre un líquido y un gas”, es decir, puede difundir como un gas (efusión), y disolver sustancias como un líquido (disolvente).
- ♦ **Fotón:** Partícula de luz que se propaga en el vacío.
- ♦ **Genotoxicidad:** Es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos.
- ♦ **Hiperplasia:** Aumento anormal de tamaño que sufre un órgano o un tejido orgánico debido al incremento del número de células normales que lo forman.
- ♦ **Isomerización:** Proceso químico en que una molécula es transformada en otra pero posee los mismos átomos pero dispuestos en forma distinta.

- ◆ **Liofilización:** es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación.
- ◆ **Mácula:** Lesión cutánea que consiste en una alteración circunscrita del color de la piel diferente del tejido que la rodea.
- ◆ **Medicamento:** Sustancia o preparado que sirve para curar o prevenir una enfermedad, para reducir sus efectos sobre el organismo o para aliviar un dolor físico.
- ◆ **Metabolito:** Es cualquier sustancia producida durante el metabolismo (digestión u otros procesos químicos corporales). El término metabolito también se puede referir al producto que queda después de la descomposición (metabolismo) de un fármaco por parte del cuerpo.
- ◆ **Metabolito secundario:** Compuesto orgánico sintetizado por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo.
- ◆ **Mutágeno:** Una sustancia o agente físico que causa mutaciones, es decir, que altera de forma permanente el ADN de las células.
- ◆ **Nauplios:** Es la primera larva característica de los crustáceos. Posee forma piriforme (aproximadamente, de "pera") y presenta sólo tres pares de apéndices cefálicos: anténulas, antenas y mandíbulas, con los que nada.
- ◆ **Pápula:** Pequeño tumor eruptivo de la piel, que se resuelve espontáneamente sin dejar cicatriz.
- ◆ **Peroxisoma:** Orgánulo citoplasmático en forma de vesículas que contiene oxidasas y catalasas. Como la mayoría de los orgánulos, los peroxisomas solo se encuentran en células eucariotas.
- ◆ **Polifenoles:** Grupo de sustancias químicas encontradas en plantas caracterizadas por la presencia de un grupo fenol por molécula.
- ◆ **Quimiopreventivo:** Sustancias químicas usadas para prevenir la aparición de una enfermedad
- ◆ **Solubilidad:** Capacidad de una sustancia o un cuerpo para disolverse al mezclarse con un líquido.
- ◆ **Terapéutico:** Alude a la rama de la medicina que se encarga de la difusión de las pautas del suministro de remedios para tratar problemas de salud.
- ◆ **Teratogénico:** Sustancia o agente físico u organismo capaz de provocar un defecto congénito durante la gestación del feto.
- ◆ **Terpeno:** Compuesto orgánico de origen natural, también conocido como isoprenoide, ya que su estructura se basa en la repetición de unidades de isopreno (C₅H₈)

RESUMEN:

La psoriasis es una enfermedad cutánea inflamatoria que afecta aproximadamente al 2% de la población mundial, caracterizada por la presencia de un estrés oxidativo a nivel de la piel y la sangre de individuos afectados. Los polifenoles son moléculas reconocidas por sus propiedades antioxidantes que se presentan en una gran concentración en las cortezas de árboles, los que han sido pobremente estudiados desde el punto de vista toxicológico con vistas a generar tratamientos seguros para esta enfermedad. El objetivo general de este trabajo es estudiar las propiedades antioxidantes y toxicológicas de extractos polifenólicos de cortezas de especies de encinos mexicanos (*Quercus*. sp) con vistas a proponer aplicaciones en el desarrollo de productos farmacéuticos orientados al tratamiento de la psoriasis. Se realizó la colecta e identificación botánica de cortezas de *Quercus laurina*, *Quercus crassifolia* y *Quercus scytophylla* en Ciudad Hidalgo, Michoacán, México. La extracción de las cortezas secas y pulverizadas fue realizada por dos métodos: maceración (etanol/agua 90:10 v/v) y agua caliente con recirculación. El contenido de fenoles totales, ácidos hidrocínámicos, proantocianidinas y flavonoides fue determinado. La capacidad de los extractos crudos para captar el anión superóxido, así como a los radicales hidroxilos, peróxilo, el peróxido de hidrógeno, el óxido nítrico y el ácido hipocloroso se analizó por métodos espectrofotométricos. El extracto bruto con mayor capacidad antioxidante, fue purificado por extracción líquido/líquido y su capacidad antioxidante re-evaluada. La toxicidad del extracto purificado a corto plazo se realizó a partir de la determinación de la concentración letal 50% (CL₅₀) sobre nauplios de *Artemia franciscana*. Los extractos de *Q. crassifolia* (EQC) obtenidos al agua caliente y maceración, así como el de *Q. laurina* por maceración presentaron el mayor contenido de fenoles totales. En cuanto al contenido de flavonoides, el extracto de *Q. crassifolia* obtenido por extracción al agua caliente presentó los mayores contenidos de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos. La mayor cantidad de proantocianidinas se obtuvo con el extracto de *Q. crassifolia*, obtenido por maceración. El EQC mostró la mejor capacidad para captar el radical hidroxilo (EC₅₀ = 918.19 µg/ml), el anión superóxido (EC₅₀ = 80.45 µg/ml) y el peróxido de hidrógeno (EC₅₀ = 596.92 µg/ml) mientras que el extracto de *Q. laurina* presentó la mejor capacidad para captar al óxido nítrico (EC₅₀ = 149.47 µg/ml) y ácido hipocloroso (EC₅₀ = 386.94 µg/ml). El EQC purificado mejoró significativamente su capacidad antioxidante en cuanto a la captación del anión hidroxilo, radical superóxido, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso comparativamente a su equivalente bruto de partida. Dicho extracto no provocó mortalidad después de 72h sobre los nauplios de *A. franciscana*. Los resultados obtenidos perfilan al extracto de *Q. crassifolia* al agua caliente como el extracto más prometedor para el desarrollo de un producto farmacéutico orientado al tratamiento de la psoriasis.

Palabras claves: *Quercus*, encinos, polifenoles, toxicidad, antioxidante, purificación.

ABSTRACT:

Psoriasis is an inflammatory skin disease that affects approximately 2% of the world population, characterized by the presence of oxidative stress on the skin and blood of affected individuals. Polyphenols are natural molecules recognized for their antioxidant properties that are present in a high concentration in tree barks. These molecules have been poorly studied from a toxicological point of view in order to generate safe treatments for this disease. The aim of this work is to study the antioxidant and toxicological properties of polyphenolic extracts from barks of Mexican oaks (*Quercus*. sp) in order to propose applications for developing new antipsoriatic treatments. At the first time, the botanical identification of collected barks from *Quercus laurina*, *Quercus crassifolia* and *Quercus scytophylla* was performed in Ciudad Hidalgo, Michoacán. The extraction of dried and pulverized bark was performed by two methods: maceration (ethanol/water 90:10 v/v) and hot water extraction. The content of total phenols, hydroxycinnamic acids, proanthocyanidins and flavonoids was determined. The ability of crude extracts to scavenge superoxide, hydroxyl and peroxy radicals, as well as hydrogen peroxide, nitric oxide and hypochlorous acid was analyzed by spectrophotometric methods. The crude extract with the highest antioxidant capacity was purified using liquid/liquid extraction and re-evaluated regarding its antioxidant capacity. The short-term toxicity of purified extract was made by determining its lethal concentration 50% (LC50) on brine shrimp of *Artemia franciscana*. Results show that *Q. crassifolia* extracts (EQC) by maceration and hot water extraction, as well as the *Q. laurina* extract from maceration presented the highest total phenol content. As to the content of flavonoids, *Q. crassifolia* obtained by hot water extraction showed the highest content of flavonoids and hydroxycinnamic acids. The most important content of proanthocyanidins was determined to be in the *Q. crassifolia* extract obtained by maceration. The EQC showed the best ability to capture the hydroxyl radical ($EC_{50} = 918.19 \mu\text{g/ml}$), superoxide anion ($EC_{50} = 80.45 \text{ mg/ml}$) and hydrogen peroxide ($EC_{50} = 596.92 \mu\text{g/ml}$) while the extract of *Q. laurina* presented the best ability to capture nitric oxide ($EC_{50} = 149.47 \mu\text{g / ml}$) and hypochlorous acid ($EC_{50} = 386.94 \mu\text{g/ml}$). The purification of the crude hot water extract from *Q. crassifolia* significantly improved its antioxidant capacity in terms of capturing hydroxyl anion, superoxide radical, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. This purified extract did not cause mortality after 72h on *A. franciscana* nauplii. Results here obtained outline *Quercus crassifolia* hot water extract as the most promising for the development of a pharmaceutical product oriented to the psoriasis treatment.

Keywords: *Quercus*, oaks, polyphenols, toxicity, antioxidant, purification

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades dermatológicas constituyen un motivo principal de consulta en atención primaria. En México el 2% de la consulta dermatológica está relacionada con individuos que presentan psoriasis, con una incidencia aproximada de 2.5 millones de mexicanos, de los cuales, el 25-30% cursa un cuadro clínico de moderado a severo (Ramos-OE, et al., 2013). Desde el punto de vista médico, el término psoriasis se emplea para definir un conjunto de dermatosis crónicas inflamatorias, en la que la psoriasis en placas (*psoriasis vulgaris*) es la forma más prevalente. La psoriasis tiene un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes, fundamentalmente de aquellos con psoriasis moderada o severa (25-35%), al punto que las repercusiones sobre sus funciones físicas y psicológicas se han comparado con las del cáncer, la hipertensión, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes o la depresión (Rapp, et al., 1999).

La *psoriasis vulgaris* se caracteriza principalmente por la existencia de un estrés oxidativo agudo que afecta la piel y la sangre de los individuos afectados. Hasta el momento esta enfermedad no tiene cura, por lo que la industria farmacéutica está cada vez más interesada en el desarrollo de nuevos medicamentos y productos naturales para un tratamiento eficaz y seguro de esta enfermedad (García-Pérez, et al., 2012).

El desarrollo farmacéutico es un conjunto ordenado de etapas que toman un número considerable de tiempo en las que tiene lugar el desarrollo de un nuevo medicamento. Este proceso implica las fases siguientes: 1) fase de descubrimiento; 2) fase de investigación preclínica; 3) fase de investigación clínica, 4) fase de aprobación y registro y 5) fase de desarrollo químico-farmacéutico (Fundación para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica., 2012). La fase preclínica sirve para caracterizar principalmente el perfil de seguridad del candidato a fin de reducir y anticipar en lo posible el riesgo existente para humanos antes de comenzar la fase clínica de investigación, por lo que la realización de pruebas toxicológicas resulta de vital importancia durante esta etapa.

Estudios recientes han sugerido que los polifenoles, moléculas omnipresentes en el reino de las plantas, podrían ser candidatos terapéuticos de interés para el tratamiento de la psoriasis (García-Pérez, et al., 2014). Los polifenoles son moléculas multifuncionales reconocidas como excelentes agentes antioxidantes y antiinflamatorios, siendo actualmente el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas, y para interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares, puede deberse, al menos en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares importantes para la patogénesis de estas enfermedades. Por todo lo anterior se considera que esta polivalencia en cuanto a su mecanismo

de acción podría constituir una ventaja para su utilización potencial en el tratamiento y la prevención de dichas enfermedades multicausales como la psoriasis (García-Pérez, 2012). Sin embargo, para establecer su rol predominante para el tratamiento de esta enfermedad, resulta importante estudiar su utilidad terapéutica y analizar sus propiedades toxicológicas con el objetivo de poder conocer a largo plazo su beneficio/riesgo.

Los polifenoles son moléculas de naturaleza polar que se presentan en grandes concentraciones en las cortezas de árboles, frecuentemente consideradas como residuos de la industria forestal. Esto resulta un aspecto muy interesante ya que su utilización en la obtención de extractos bioactivos podría representar una nueva perspectiva para el aprovechamiento y manejo de estos residuos permitiendo su valorización a través del desarrollo de nuevos productos naturales de alto valor añadido.

Tomando en consideración los aspectos anteriores, en la presente investigación se propuso determinar la composición química, propiedades antioxidantes y toxicológicas de extractos polifenólicos provenientes de cortezas de tres encinos mexicanos con vistas a proponer aplicaciones en el desarrollo de nuevos productos naturales antipsoriásicos. Las propiedades toxicológicas se analizaron sobre el organismo *Artemia franciscana*, el cual es muy utilizado por la facilidad de su cultivo, ciclo de vida rápido y amplia distribución.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS Y SU IMPORTANCIA PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS MEDICAMENTOS

Desde tiempos muy remotos, el hombre ha utilizado los recursos naturales con propiedades terapéuticas como fuente principal de medicamentos. El papiro de Ebers, redactado cerca del año 1500 antes de nuestra era por los egipcios, es probablemente uno de los primeros documentos donde se describen enfermedades y sus tratamientos mediante el uso de plantas. En la Biblia aparecen aproximadamente 200 plantas de uso medicinal y sus aplicaciones. Son también reconocidas las escuelas árabes y la de Salerno en Italia en los siglos XII y XIII por sus renombrados médicos y la utilización extensiva de plantas, muchas de las cuales son reconocidas en la actualidad por sus propiedades terapéuticas (Marinoff, 2006).

En México desde la época prehispánica, los mayas, que abarcaron lo que ahora se consideran como los estados de Tabasco, Chiapas, Campeche, Yucatán y Quintana Roo empleaban plantas con usos terapéuticos, conocimientos que, con algunas variantes, han persistido hasta la actualidad, valiéndose de especies comúnmente presentes en los patios, jardines o bosques (Mercedes-Rodríguez, 2015). Otra civilización importante en México fue la de los aztecas o mexicas, que desarrollaron medicina y una farmacopea eficaz con plantas, minerales y algunos animales basándose en conocimientos empíricos muy avanzados para la época con testimonios descritos desde el siglo XV por iniciativa de los conquistadores con el objetivo de estudiar la medicina indígena en todos sus aspectos (Pijoan, 2003).

Los remedios naturales ayudan a la recuperación del organismo como consecuencia de los desequilibrios producidos por enfermedades, ya que con su uso se puede reducir el dolor, aminorar la fiebre, combatir una infección o prevenir la aparición de enfermedades. La obtención de medicamentos surge desde los preparados de plantas u hongos medicinales usados empíricamente. Hoy se sabe que estos beneficios son brindados por compuestos que llamamos “metabolitos” que son moléculas producidas por plantas, hongos, microorganismos u organismos marinos. Dentro de los metabolitos secundarios más reconocidos por su bioactividad se encuentran los terpenos, alcaloides y polifenoles que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. En la actualidad muchos medicamentos provienen de recursos naturales y el impacto benéfico se refleja en la esperanza de vida que supera los 70 años, mientras que antiguamente 35 años era una esperanza de vida inalcanzable para muchos (García-Perez, 2015).

El aislamiento del primer alcaloide natural, la morfina, analgésico proveniente de la planta de amapola (*Papaver somniferum*) constituyó todo un hito para la industria farmacéutica moderna. Los avances tecnológicos permitieron que en 1897 Félix Hoffman de Bayer aislara el ácido salicílico a partir de la corteza del sauce (*Salix*

sp) y generara una modificación estructural que se patentó como Aspirina, el analgésico más popular en el mundo (Gilbert M. Rishton, 2008), (García-Perez, 2015).

En 1928 el descubrimiento de la penicilina por Fleming, y los trabajos clínicos y de purificación de los investigadores Chain y Florey, permitieron obtener en masa el antibiótico procedente de *Penicillium notatum*, lo que generó el surgimiento de la “Edad de oro” en los antibióticos, intensificándose la investigación en busca de agentes bioactivos a partir de microorganismos. Es así que hoy día están en el mercado numerosos principios activos como penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, tetraciclinas y otros que han revolucionado la medicina moderna fundamentalmente en lo concerniente a la terapia antinfeciosa (Laza-Loaces, et al., 2003). (Viruez-Soto, 2008)

Debido al avance tecnológico en las ciencias farmacéuticas se han obtenido y estudiado numerosos compuestos de origen natural, los que se han modificado para potencializar sus efectos farmacológicos aumentando su seguridad y mejorando su manufactura y producción. Sin embargo, hay moléculas que, a pesar de la tecnología moderna, no han podido obtenerse de manera sintética, siendo el caso de la Trabectedina, aislada del organismo marino *Ecteinascidia turbinata* registrada recientemente para el tratamiento del cáncer por las agencias reguladoras de Estados Unidos y Europa (García-Perez, 2015).

Hoy en día, podemos mencionar un tipo de medicamentos donde el 60% es de origen natural: los compuestos anticancerígenos. Puede nombrarse por ejemplo la epipodofilotoxina extraída de la raíz de *Podophylum peltatum* usada para el tratamiento de cáncer de pulmón y testículos, la homoharringtonina extraída de coníferas del género *Cephalotaxus* originarios del sur de China para el tratamiento de la leucemia aguda o la bruceantina, aislada de *Brucea antidysenterica*, para el tratamiento de leucemias, linfomas y mielomas (Laza-Loaces, et al., 2003) (García-Perez, 2015). Estos son algunos ejemplos de la importancia de los medicamentos de origen natural en la innovación de terapias contra las enfermedades.

Las estructuras químicas de las moléculas naturales encierran varios centros estereogénicos y poseen generalmente gran flexibilidad lo que les permite adoptar una multitud de conformaciones espaciales facilitándoles una unión óptima a las dianas farmacológicas. Además, debido al tamaño relativamente grande de sus estructuras pueden unirse a grandes superficies y se consideran “estructuralmente privilegiadas”, sirviendo como punto de partida para la búsqueda de nuevos candidatos terapéuticos en la actualidad (Butler, 2008).

El camino hacia la identificación de un fármaco es largo y azaroso, pero considerando que son pocas las especies naturales estudiadas desde el punto de vista fitoquímico y farmacológico (alrededor del 15%), podría esperarse que en el futuro una innumerable cantidad de compuestos sean obtenidos para la fabricación de nuevos medicamentos. Sin embargo, es importante considerar que

algunas especies están en peligro de extinción y se deben buscar estrategias para poder trabajar en la búsqueda de nuevos medicamentos de fuentes naturales con el adecuado respeto a la naturaleza y la biodiversidad (García-Perez, 2015).

2.2 LOS POLIFENOLES

Los polifenoles son moléculas provenientes de las plantas con capacidad antioxidante. Desde el punto de vista químico se reconocen como un conjunto de moléculas que poseen en su estructura química al menos un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo. Son de gran importancia para la fisiología de las plantas, pues contribuyen a la resistencia del ataque de microorganismos e insectos, ayudan a preservar su integridad frente a la exposición a agentes estresantes ambientales, como la radiación ultravioleta o la temperatura (Sepúlveda-Jiménez, et al., 2003).

La biosíntesis de los polifenoles se da por dos rutas primarias: la ruta del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido shikímico proporciona la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), de ácidos cinámicos y sus derivados (ácidos fenólicos, fenoles sencillos, lignanos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropanol), mientras que la ruta de los poliacetatos permite la síntesis de quinonas y xantonas (Stevanovic, et al., 2009) (Quiñonez, et al., 2012).

La concentración de compuestos fenólicos se ve afectada por las especies de plantas, el tipo de tejido, la madurez en la cosecha, las condiciones de cultivo, el suelo condiciones, la temporada de tala, el tratamiento posterior a la cosecha como el secado y almacenamiento, así como las condiciones de procesamiento tales como disolvente y la temperatura de extracción, el tamaño de partícula de la muestra y tiempo de procesamiento (Martínez-Flórez, et al., 2002).

2.2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS POLIFENOLES

Existen varias clases y subclases de polifenoles, dependiendo del número de anillos y sustituyentes. Entre los grupos principales se encuentran los fenoles simples, ácidos fenólicos (benzoicos e hidroxicinámicos), estilbenos, lignanos, neolignanos, flavonoides y taninos (hidrolizables y condensados).

Fenoles simples

Están representados, por los fenoles que tienen un esqueleto C₆, C₆-C₁, C₆-C₂ o C₆-C₃, es decir, un anillo de benceno y una cadena de uno, dos o tres carbonos (Figura 1). Dentro de estos fenoles tenemos a la vainillina, el catecol, la hidroquinona y el resorcinol (Antolovich, et al., 2000).

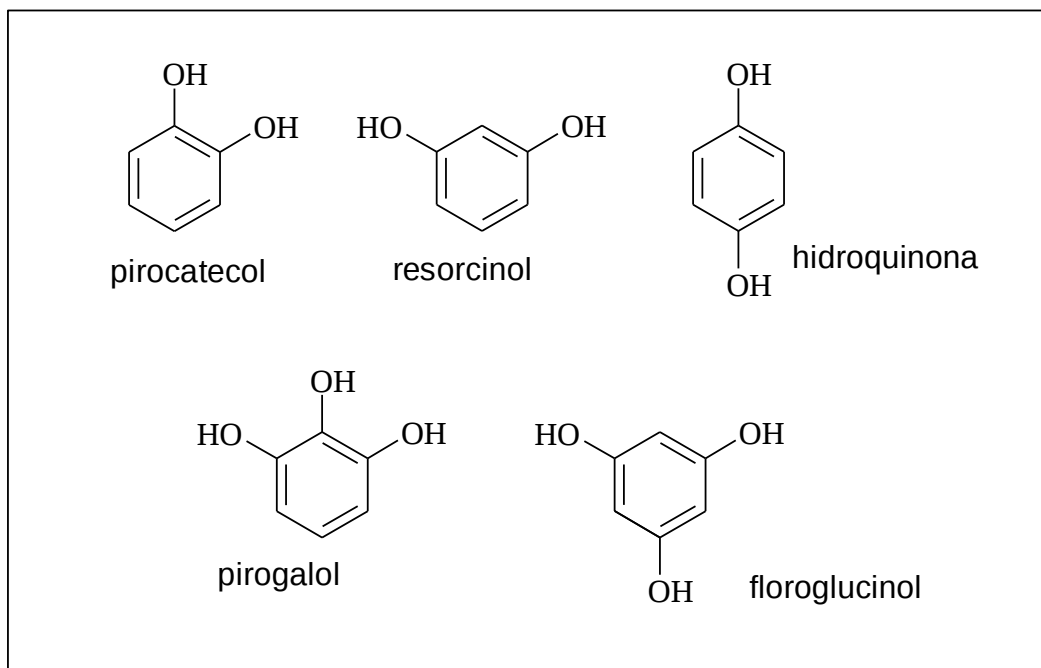


Ilustración 1. Ejemplos de fenoles simples.

Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos están ampliamente distribuidos en la naturaleza. En este grupo se encuentran los compuestos que tienen como mínimo una función carboxílica y un dihidróxido fenólico. Dos tipos fundamentales de ácidos fenólicos son conocidos: los derivados de ácidos benzoicos y los derivados de ácidos cinámicos. Dentro de los derivados de ácidos benzoicos tenemos al ácido gálico y al ácido protocatético y sus dímeros. Estos compuestos tienen una estructura química de tipo C6-C1. Los encontramos en los frutos secos, bayas, avellanas, frambuesas, moras, fresas etc. (Stevanovic, et al., 2009). Los derivados de ácidos cinámicos están constituidos por un anillo aromático, un grupo alifático y un grupo carboxílico al extremo. Como fuentes alimenticias de ácidos hidroxycinámicos se encuentran en el café, las manzanas, los arándanos y las sidras. El ácido cumárico se presenta en las espinacas o el salvado; mientras que otros ácidos hidroxycinámicos como el ácido ferúlico están presente en zumos de cítricos y café. El ácido sinápico ha sido identificado en el brócoli y los zumos de cítricos (Stevanovic, et al., 2009).

Estilbenos:

El estilbeno es por definición el 1,2 difeniletano. Estas moléculas presentan un esqueleto C6-C2-C6 y forman la familia de los stilbenoides. Los árboles presentan una fuerte concentración de estilbenos, mucho más que los alimentos de consumo habitual. Las fuentes más ricas en estilbenos en la naturaleza son el chocolate negro, uvas, cacahuates, cortezas de *Picea mariana* y raíces de *Polygonum*

cuspidatum, una especie usada en la medicina tradicional china y japonesa (Vastano, et al., 2000), (Stevanovic, et al., 2009).

Lignanos y neolignanos

Son sustancias polifenólicas, consideradas como dímeros naturales del fenilpropano. Cuando las unidades de fenilpropano están unidas por enlaces carbono-carbono a nivel de las posiciones 8-8' el compuesto se considera un lignano. Cuando las unidades de fenilpropano se unen en otra posición se trata de un neolignano (Figura 2). Por su similitud al estradiol, los lignanos son considerados fitoestrógenos naturales. Están presentes en lentejas, ajo, espárragos, zanahoria, peras, centeno y ciruelas pasas (Stevanovic, et al., 2009). Los neolignanos tienen una importancia en la regulación de la relación planta-insecto, planta-hongo y planta-planta además de participar en funciones moleculares como la inhibición de la polimerización de la tubulina, la síntesis y el transporte del ADN y de ciertas enzimas (García Muñoz, 2006) .

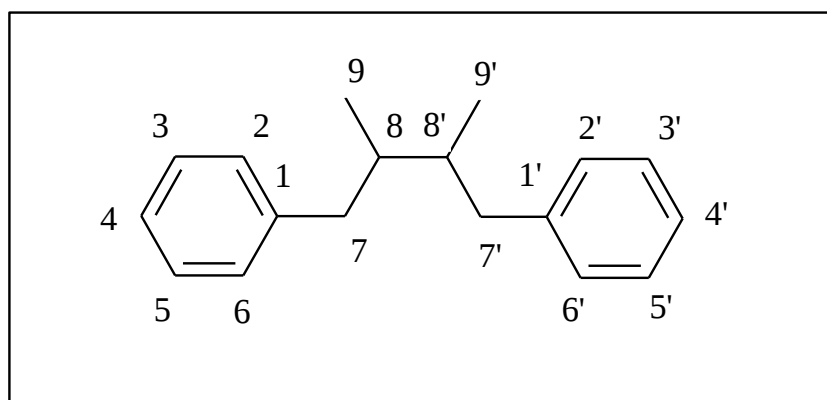


Ilustración 2. Estructura de los lignanos.

Flavonoides:

Los flavonoides constituyen la subclase de polifenoles más abundante en el reino vegetal. Son compuestos de bajo peso molecular con un esqueleto común difenilpirano (C6-C3-C6). Estos compuestos presentan los dos anillos fenilo (A y B) están ligados con un anillo de pirano heterocíclico (C). Los flavonoides se pueden presentar en la naturaleza como sulfatos, dímeros, polímeros o glucósidos. Los glucósidos se pueden encontrar de dos formas: O-glucósidos con los carbohidratos ligados por átomos de oxígeno, o como C-glucósidos, ligados a carbohidratos con enlaces carbono-carbono. De todas estas formas, predominan los O-glucósidos (Quiñonez, et al., 2012). Existen varios subgrupos de flavonoides, clasificados en función del estado de oxidación de los anillos (Figura 3). Es así que dentro de este grupo se encuentran los flavonoles, flavonas, flavononas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles. Los flavonoides se encuentran en altas concentraciones en el té, el vino, las frutas, las verduras, así

como en leguminosas como la soya y sus derivados o los frijoles (Quiñonez, et al., 2012).

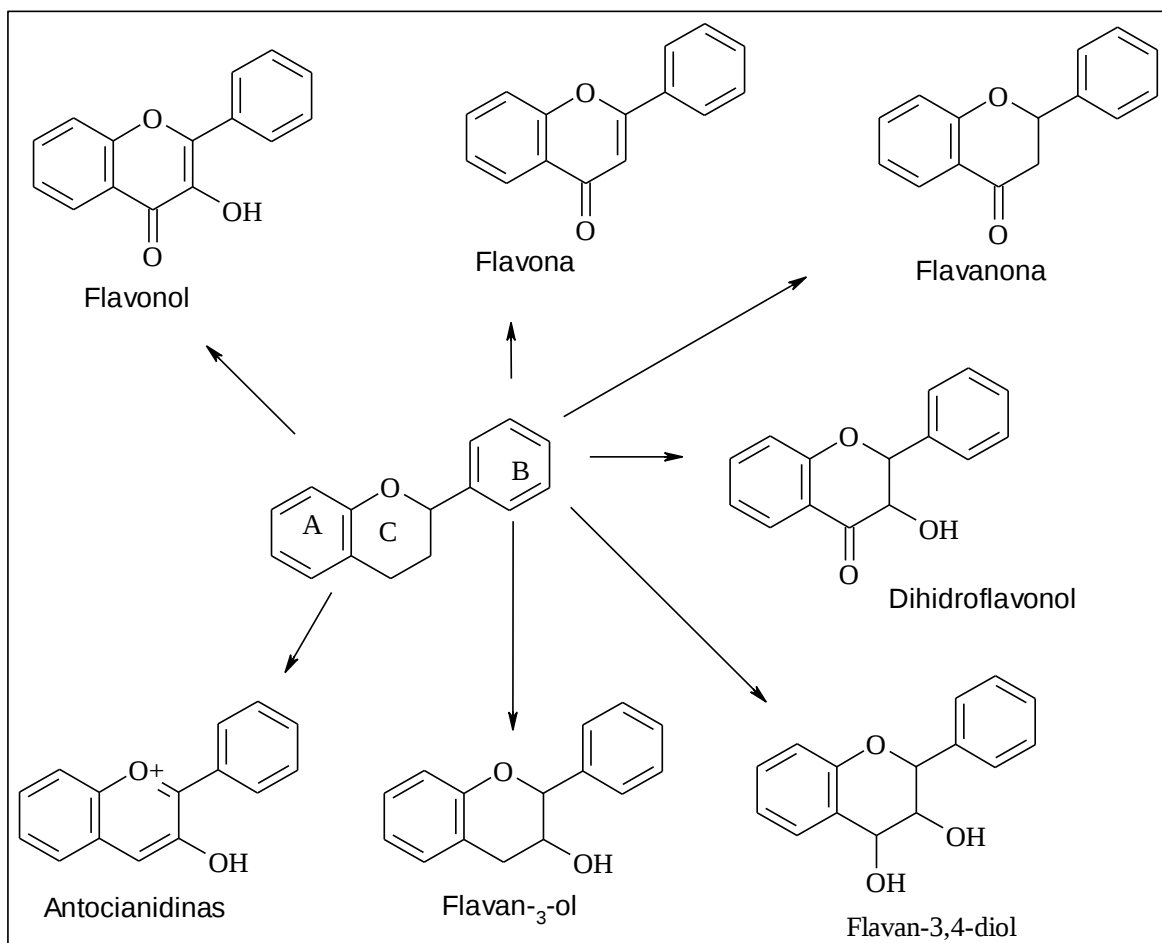


Ilustración 3. Familia de los flavonoides.

Taninos:

Los taninos son polímeros complejos con fórmula aproximada $C_{14}H_{14}O_{11}$. Son solubles en agua, pueden precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas, interactuar con metales quelantes y tienen una buena actividad antioxidante. Sus propiedades curtientes son utilizadas durante la transformación de la piel en cuero. Los taninos contenidos en los vinos tintos determinan su sabor y color. Las fuentes primarias de taninos en el vino son las semillas de uva y pieles que contienen proantocianidinas o taninos condensados—(Stevanovic, et al., 2009). Dentro de este grupo se distinguen los taninos hidrolizables y los condensados. Los taninos hidrolizables tienen un peso molecular más bajo que los taninos condensados. Son polímeros heterogéneos formados por ácidos fenólicos, como el ácido gálico y azúcares simples y son hidrolizados con facilidad. Los taninos hidrolizables se dividen en galotaninos y elagitatinos. Los taninos condensados, también llamados proantocianidinas, son polímeros de la antocianidina, un flavonoide. Son

oligómeros y polímeros compuestos de unidades flavan-3-oles y flavan-3,4-dioles (Stevanovic & Perrin, 2009). Son moléculas dotadas de potentes capacidades antioxidantes. Se encuentran en cantidades elevadas en arándanos la piel y semillas de la uva y corteza de pino (Stevanovic, et al., 2009).

2.2.2 METODOS DE EXTRACCIÓN

La extracción de polifenoles a partir de plantas es un proceso que posee ciertas particularidades a fin de proteger la integridad de las moléculas. Para escoger un método adecuado de extracción de polifenoles, resulta de vital importancia considerar el tipo de compuestos a obtener o analizar (flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, etc.) y la naturaleza de la matriz biológica a utilizar (planta, hoja, fruto, semilla, etc.), así como el grado de toxicidad y polaridad de los solventes a utilizar. El rendimiento de extracción depende en gran parte de la manipulación y las condiciones que se utilicen para evitar la oxidación o isomerización de los compuestos. La adición de antioxidantes, la extracción a temperaturas bajas y la utilización de atmósferas inertes son propuestas para evitar la oxidación, degradación térmica o cambios físico-químicos en los polifenoles (Antolovich, et al., 2000).

Entre los métodos conocidos hoy en día para la extracción de polifenoles, la maceración es una de las técnicas más utilizadas ya que, a pesar de que consume una gran cantidad de tiempo, los solventes utilizados son relativamente baratos, además de que se realiza a temperatura ambiente lo que permite mantener la integridad de las moléculas polifenólicas.

Otra técnica muy utilizada es la extracción con Soxhlet. Este método permite una extracción continua, además de que es sencillo y también barato, sin embargo, las manipulaciones secundarias, las altas temperaturas y el tiempo de extracción pueden ser inconvenientes que pudieran modificar las características de las moléculas de la matriz vegetal original (García-Sánchez, et al., 2005).

Otro método utilizado es la extracción asistida por ultrasonido la que involucra dos fenómenos físicos: la difusión y el rompimiento de las paredes celulares de los organismos vegetales. Éste método resulta más eficiente que los procedimientos tradicionales permitiendo una maximización del rendimiento de extracción (Azuola & Vargas-Aguilar, 2007).

La extracción en fase sólida es otra opción rápida y económica, ya que se reducen los volúmenes de solventes y tiempo de análisis. Su finalidad es extraer compuestos de una matriz líquida y resulta un complemento a la extracción del solvente. Este método es también usado como método de fraccionamiento y/o purificación (Peña, et al., 2003). La extracción utilizando diferentes pH también se ha descrito como un método eficiente de extraer polifenoles de las matrices

vegetales. Este tipo de extracción se utiliza para separar los ácidos fenólicos, catequinas y dihidrochalconas, pero los bajos rendimientos de extracción limitan su uso (Escribano-Bailón & Santos-Buelga, 2003).

La extracción con fluidos supercríticos ha adquirido un gran impulso en los últimos años. Esta técnica combina las características de los gases y los líquidos para la extracción. La baja viscosidad de los fluidos supercríticos con alta capacidad de difusión, permiten el acceso del disolvente a los compuestos fenólicos que se encuentran ligados a las paredes celulares. Los procesos de degradación, isomerización y oxidación se reducen mínimamente en un tiempo de extracción corto, además de que la extracción se lleva a cabo en ausencia de aire y luz. Sin embargo, el dióxido de carbono supercrítico, que es el solvente más utilizado, no permite la solubilización de los compuestos fenólicos más polares, lo que reduce el porcentaje de extracción. Esta es una de las desventajas que se le han señalado (Escribano-Bailón & Santos-Buelga, 2003).

La extracción asistida por microondas es una técnica que combina el uso de un horno de microondas con otras técnicas de extracción tradicionales. Las ventajas de este método son la reducción del tiempo de extracción, el uso de cantidades menores de disolvente y la obtención de rendimientos de extracción más elevados (Izquierdo, et al., 2013).

En todas las técnicas, la elección del disolvente es de suma importancia para lograr un mayor rendimiento de extracción (Hemwimon, et al., 2007) (Naima, et al., 2015). Los solventes más utilizados para la extracción de polifenoles son el agua, metanol, acetona y acetato de etilo; en agua son más solubles los polifenoles asociados con azúcares, por ello la combinación de disolventes con agua se utiliza con frecuencia para extraer glucósidos (Escribano-Bailón & Santos-Buelga, 2003).

El acetato de etilo se ha utilizado para obtener extractos ricos en ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas (Ignat, et al., 2011), también se utiliza para la purificación de extractos crudos obteniendo fracciones enriquecidas de flavonoides y proantocianidinas oligoméricas (Diouf, et al., 2009). La mezcla acetona/agua se ha utilizado para la extracción de fenoles, mostrando mejor rendimiento la acetona al 80% (Turkmen, et al., 2006). Las mezclas de metanol/agua al 70-80% resultan con excelentes rendimientos de extracción de flavonas, flavonoles y catequinas (Bocco, et al., 1998), mientras que la mezcla metanol/agua 50:50 V:V es más eficiente que la acetona para la extracción de polifenoles (Escribano-Bailón & Santos-Buelga, 2003), sin embargo, su uso está restringido debido a su toxicidad (Ignat, et al., 2011).

2.2.3 IMPORTANCIA DE LOS POLIFENOLES COMO AGENTES ANTIOXIDANTES

Los radicales libres (RL) son átomos o grupos de átomos que tienen uno o más electrones desapareados lo que los convierte en especies químicas altamente reactivas, ya que en busca de una mayor estabilidad electroquímica tienden a captar un electrón a partir de moléculas estables (Avello & Suwalsky, 2006). Una vez que el RL sustrae el electrón, la molécula estable que lo cede se convierte ahora en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena. La vida media biológica de un RL es de microsegundos, pero al ser tan reactivo, provoca un gran daño a las moléculas que conforman a las diferentes estructuras celulares, destruyendo de ésta manera a las células (Avello & Suwalsky, 2006).

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se pueden clasificar en dos grupos. El primero incluye los radicales libres, que son las especies moleculares con electrones no apareados, tales como el radical hidroxilo ($\text{OH}\bullet$); anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$); peroxilo ($\text{ROO}\bullet$); el óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) y el radical alcoxilo ($\text{RO}\bullet$). El segundo grupo está formado por compuestos no radicales como ácido hipocloroso altamente reactivo (HClO), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), aldehídos y ozono. El organismo humano produce de manera natural radicales libres a bajas concentraciones (radical hidroxilo $\text{OH}\cdot$, anión superóxido $\text{O}_2\cdot$, óxido nítrico $\text{NO}\cdot$) que intervienen en la respuesta inmunológica contra bacterias y virus, en el proceso de traducción de señales, la proliferación celular y la apoptosis, sin embargo, cuando se excede cierta cantidad pueden ser deletéreos (García-Pérez, et al., 2010). Los radicales libres en nuestro organismo se producen fundamentalmente: a) a nivel de la respiración mitocondrial; b) en ciertos orgánulos celulares como los peroxisomas; c) por la acción de diversas oxidasas celulares; d) durante la fagocitosis (Finkel, 2000).

Entre los radicales libres está el oxígeno molecular (O_2) un birradical, es decir, tiene dos electrones desapareados en su orbital exterior, ambos con el mismo giro paralelo, impidiendo que capte dos electrones simultáneamente en las reacciones en las que participa. El oxígeno solo puede intervenir en reacciones univalentes y aceptar los electrones de uno en uno (Rodríguez-Perón, et al., 2001). El O_2 por su reducción parcial genera las siguientes especies reactivas: 1) el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$); 2) el radical hidroxilo $\text{OH}\cdot$; 3) el peróxido de hidrógeno H_2O_2 ; 4) el oxígeno singlete. El H_2O_2 no es un radical libre, pero su capacidad de formar $\text{OH}\cdot$ en presencia de metales como el hierro, lo engloba como tal (Rodríguez-Perón, et al., 2001).

La producción de radicales libres aumenta con la contaminación y el tabaquismo los que pueden inducir la formación de peróxido de hidrógeno por los leucocitos humanos y causar daños en el ADN. El aumento o disminución de la concentración de las especies reactivas de oxígeno por debajo o por encima de un

límite pernicioso, es motivo de la patogenia de enfermedades degenerativas, la aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, muerte celular y cáncer (Avello & Suwalsky, 2006) (Villanueva-Tiburcio, et al., 2010).

El organismo tiene un sistema de defensa contra los radicales libres, una de estas defensas son las enzimas citosólicas (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, glutatión transferasa). La acción protectora de estas enzimas se complementa con la de antioxidantes naturales presentes en las estructuras lipoproteicas (α -tocoferol, carotenoides, licopeno, ubiquinol) y en el citosol de las células (ácido ascórbico, glutatión reducido) (Hadi, 2004). Estos antioxidantes son moléculas que, al interaccionar con un radical libre tienden a cederle un electrón, oxidándose y a su vez, transformándose a un RL no tóxico y menos reactivo. Los antioxidantes pueden ingresar al organismo a través de la dieta como es el caso de las vitaminas (ácido ascórbico, alfa-tocoferol, beta-caroteno), los carotenoides (luteína, licopeno) y los polifenoles (flavonoides y no flavonoides) (Avello & Suwalsky, 2006) (Villanueva-Tiburcio, et al., 2010).

Los grupos hidroxilo de los polifenoles pueden aceptar un electrón para formar radicales fenoxilo relativamente estables, rompiendo de este modo las reacciones en cadena que conducen a la oxidación en las células. Los polifenoles son potentes inhibidores de la peroxidación de lípidos, elementos importantes en la protección de las membranas celulares. Algunos polifenoles se han identificado como sustancias moduladoras del proceso de carcinogénesis. Los flavonoides han demostrado poseer efectos antimutagénicos y anticancerígenos, así como poseer acciones quimiopreventivas (Martínez-Flórez, et al., 2002).

Los polifenoles son de gran importancia para la salud. La teoría de “la paradoja francesa” evidencia los beneficios en el consumo del vino en la dieta mediterránea, pues parte de ésta población ingiere más grasas que los estadounidenses, pero la incidencia de enfermedades coronarias es menor, lo cual se cree que se debe, entre otros factores, a los altos contenidos de polifenoles en ésta dieta (Avello & Suwalsky, 2006).

Entre los tipos de polifenoles y su actividad antioxidante específica, la literatura muestra que los flavonoides son excelentes agentes antioxidantes para captar a los radicales hidroxilo y superóxido además de ser agentes quelantes de iones metálicos (Martínez-Flórez, et al., 2002). Los taninos se asocian con la inhibición del anión superóxido y la eliminación del peróxido de hidrógeno (Ching-Hsein, et al., 2007), (Sánchez-Calero, et al., 2012). Los neolignan por su parte son capaces de inhibir la peroxidación lipídica (Haraguchi, et al., 1997).

2.2.4 LOS POLIFENOLES EN EL GENERO *QUERCUS*

El género *Quercus*, uno de los géneros más importantes a nivel mundial dentro de la familia Fagaceae, conformado por árboles comúnmente llamados encinos (*Quercus* sp). Los encinos se desarrollan en los bosques templados, bosques tropicales, semitropicales y en los matorrales de climas secos del hemisferio norte, muy pocos se desarrollan en los ecosistemas tropicales y semitropicales del hemisferio Sur. Destacan como centros de diversidad del género el sureste de Asia con alrededor de 125 especies y América con cerca de 250 especies distribuidas desde Canadá hasta Colombia (Arizaga, et al., 2009) (Vázquez-Cabra, et al., 2016).

Con alrededor de 161 especies, México es el mayor centro de riqueza y evolución de encinos en el continente americano. Se calcula que 109 de ellas son endémicas, es decir el 68% de los encinos del continente americano sólo se encuentran en México. Los estados con mayor riqueza de encinos son Nuevo León, Veracruz y Oaxaca. El único estado sin encinos es Quintana Roo. Sin embargo, las entidades con mayor información científica acerca de este tipo de plantas son Jalisco, Guerrero, México y Michoacán. La clasificación taxonómica es muy compleja, por la variación de formas del tronco, hojas, flores, frutos y aspecto en general de cada especie, incluso es posible encontrar distintas formas de hojas en un mismo individuo (Arizaga, et al., 2009). Seguido de los pinos (*Pinus* sp.), los encinos tienen una gran importancia forestal en México, y su uso no maderable ha sido infravalorado a pesar de que varias culturas y etnias en todo el país recolectan y procesan alimentos y medicamentos de encinos (Vázquez-Cabra, et al., 2016) (Uribe Salas & Chávez Carbajal, 2016).

En México, los primeros estudios químicos del género *Quercus* fueron realizados en la primera década del siglo XX por médicos y farmacólogos del Instituto Médico Nacional, como parte de los esfuerzos que se hacían entonces para la integración de la Farmacopea Mexicana. Estas investigaciones reportaron que de toda la estructura vegetal, la corteza es la fuente principal de sustancias astringentes, además de referirse a la bellota como un sustituto del café (Uribe Salas & Chávez Carbajal, 2016).

En el caso específico del estado de Michoacán, se reportan de 30 a 34 especies de encinos, la mayoría en bosques templados. Los encinos satisfacen el 80% de las necesidades de leña y carbón, además de ser materia para la fabricación de muebles, para la obtención de taninos para curtir las pieles, en la construcción de cabañas así como alimento para el ganado porcino, etc. (Arizaga, et al., 2009), (Uribe Salas & Chávez Carbajal, 2016).

Existe una variedad de polifenoles que se ha identificado en el género *Quercus* dentro de ellos se ha descrito una alta concentración de taninos hidrolizados en la corteza. La revisión de la literatura muestra que casi todas las investigaciones

relacionadas con la determinación de la composición química de especies pertenecientes al género *Quercus* se han realizado en especies europeas como *Quercus rubra* y *Quercus alba*. Así, varios taninos elágicos como la roburina A, B, C, D, E, la vescalagina, la castalagina y la grandinina han sido descritos en estas especies (Prida & Puech, 2006). El ácido elágico ha sido cuantificado en la madera de *Q. alba* (41 mg/g) (Bianco, et al., 1998), así como otros fenoles simples como la vainillina, el eugenol, el guayacol y el aldehído siringico (Fernandez-De-Simon, et al., 2003). Mientras que la madera de *Q. rubra* y *Q. alba* son ricas en taninos elágicos, sus cortezas contienen mayor cantidad de taninos condensados. Los polifenoles siguientes han sido identificados en las cortezas de estas especies: catequina, galocatequina, leucopelargonidina, leucocianidina, leucodelfinina y ácido gálico (Rowe & Conner, 1979).

Uno de los principales usos de las especies de encinos europeos de *Quercus* es el indispensable uso de la madera en la construcción de las barricas para el almacenamiento en la elaboración de vinos de alta calidad, pues mejora sus propiedades aromáticas, el perfil y el sabor. Este proceso implica la extracción de alcohol de los constituyentes de la madera y su interacción con los polifenoles de las uvas, presentes en vinos jóvenes. Los vinos tintos adquieren beneficios adicionales durante el almacenamiento en barricas de encino, ya que el contenido de taninos determina el sabor y el color de los vinos, que constituyen también en gran parte los beneficios para la salud relacionados al consumo del vino tinto (Chatonnet & Dubourdieu, 1998) (Stevanovic, et al., 2009).

Entre los usos no leñosos del género *Quercus*, está el uso medicinal, que por sus constituyentes polifenólicos es principalmente usado para tratar problemas del sistema gastrointestinal, lo que confiere su importancia como recurso natural complementario (Fundación carlos Slim, 2014).

2.2.5 UTILIZACIÓN MEDICINAL DE POLIFENOLES DEL GÉNERO *QUERCUS*

Los compuestos polifenólicos responsables de las cualidades astringentes del tejido vegetal, es decir, los taninos, le confieren el sabor amargo a las plantas. Estos compuestos vegetales del metabolismo secundario, cumplen una función antiséptica y cicatrizante favoreciendo la curación de las heridas. Otras de las funciones de estas sustancias astringentes son sus propiedades hemostáticas al detener el sangrado, constrictoras y antiinflamatorias (Uribe Salas & Chávez Carbajal, 2016)

El extracto metanólico de corteza de *Q. alba* presenta una actividad antioxidante comparable a la del té verde, la que se ha ligado a la presencia de catequinas y otros flavonoides (McCune & Johns, 2002). Los taninos elágicos, además de los polifenoles del vino, parecen jugar un papel en los efectos benéficos del consumo

de vino en la salud cardiovascular, pudiendo además prevenir la aparición de otros problemas de salud como el cáncer de colon (Fridrich, et al., 2008).

En cuanto al uso tradicional en el estado de Michoacán, algunas personas mastican pedazos de corteza o bellotas para curar y endurecer las encías o calmar dolencias dentales, mientras que las hojas y las cortezas son empleadas como antidiarreicos, disentería, úlcera estomacal, gastritis, hemorragia intestinal e inflamación, cáncer de estómago y hemorroides. La corteza también es usada en problemas de la piel como úlceras, erupciones, granos, llagas, heridas y piel flácida, de las especies reportadas en el estado, 14 tienen registro de usos en la medicina tradicional (Tabla 1) (Uribe Salas & Chávez Carbajal, 2016). Entre las aplicaciones medicinales, la infusión de hojas de encino, solas o combinadas con otras plantas, presentan efectos contra el cáncer gástrico. En el análisis sensorial de las infusiones se ha mostrado una relación inversa entre la aceptación por el sabor y el contenido fenólico (Vázquez-Cabra, et al., 2016).

La literatura refiere cierta actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Quercus ilex* (roble) ante hongos, levaduras y bacterias (Güllüce, et al., 2004) y *Quercus infectoria* para tratar bacterias orales y curar heridas después del parto (Fredalina-Basri, et al., 2012), mientras que *Q. sideroxyla* posee efecto contra el desarrollo de cáncer de colon (Trujillo, et al., 2015), y algunas especies reportan actividad anti-lipoperoxidante (Khenouf, et al., 2010).

Los elagitaninos de la madera del roble, además de jugar un papel importante en la fermentación del vino, tienen un efecto positivo en los problemas cardiovasculares, además de prevenir el cáncer de colon con el consumo moderado de ésta bebida. De los robles de América, se obtiene la escopoletina que es una cumarina (polifenol), que se utiliza en la medicina moderna para regular el flujo sanguíneo o antiinflamatorio incluyendo el tratamiento de la bronquitis aguda y los derivados norisoprenoides carotenoides (Fridrich, et al., 2008).

Tabla 1. Usos medicinales de los encinos del estado de Michoacán. (Uribe Salas & Chávez Carbajal, 2016).

Usos medicinales de los encinos en Michoacán			
Nombre común	Especies	Padecimientos	Formas de uso
Encino blanco, encino laurelillo	<i>Quercus acutifolia</i> Née	Dolor de estómago, diarrea, disentería, úlcera estomacal, gastritis, hemorragia intestinal, inflamación, cáncer de estómago.	Cocimiento, tomado (corteza)
Encino rojo, encino colorado, palo colorado			
Encino rosillo	<i>Quercus castanea</i> Née		
Encino pepitillo	<i>Quercus candicans</i> Née	Dentadura floja, inflamación y Sangrado de encías, dolor de dientes, úlceras bucales, gingivitis.	Cocimiento, hacer gárgaras (corteza)
Encino prieto	<i>Quercus conspersa</i> Benth.		
Encino chilillo	<i>Quercus crassifolia</i> Humb. et Bonpl.	Mejora la circulación, úlceras varicosas, hematomas, hemorroides.	Cocimiento, tomado (corteza y hojas)
	<i>Quercus crassipes</i> Humb. et Bonpl.		
Encino colorado, encino laurel, encino saucillo	<i>Quercus elliptica</i> Née		
Encino chaparro, tocuz	<i>Quercus glaucoides</i> Mart. et. Gal.	Dolor e inflamación muscular.	Cocimiento, hacer fomentos (corteza)
Encino laurelillo, encino prieto	<i>Quercus laurina</i> Humb. et Bonpl.	Infecciones vaginales, baño postparto, hemorragias vaginales, vejiga caída.	Cocimiento, hacer baños (corteza)
	<i>Quercus magnoliifolia</i> Née		
Encino amarillo, encino roble		Tos.	Cocimiento, tomado (corteza)
	<i>Quercus obtusata</i> Humb. et Bonpl.		
Encino blanco, encino chino		Úlceras en la piel, llagas, erupciones, granos, infecciones, quemaduras, heridas, piel flácida.	Cocimiento, fomento, baño o lavar la parte afectada (corteza)
	<i>Quercus planipocula</i> Trel.		
Encino			
Encino bermejo	<i>Quercus resinosa</i> Liebm.	Caída de pelo, hemorragias, diabetes, hidropesía.	Cocimiento, en baño y tomado (corteza)
Encino de miel	<i>Quercus rugosa</i> Née		

2.3 LA PSORIASIS

La psoriasis es considerada una enfermedad autoinmune, crónica e inflamatoria de la piel que afecta aproximadamente al 2% de la población mundial, con mayor prevalencia en Europa, Canadá y Estados Unidos de América, y baja incidencia en países cercanos al trópico y personas de raza negra. En los indígenas del Norteamérica, en el centro y Sudamérica afecta aproximadamente al 0.1% de la población. En México se estima que el 0.5% de la población en general son personas con psoriasis y es una de las 15 causas más frecuentes de las consultas

en el servicio de dermatología (Asociación Mexicana contra la Psoriasis, 2014) (García-Pérez, et al., 2010).

La psoriasis es una enfermedad no contagiosa, cuya manifestación más evidente es la formación de placas enrojecidas, escamosas y gruesas en la piel. Las personas con psoriasis tienen mayor tendencia a presentar diabetes, artritis psoriásica, riesgo cardiovascular y depresión. La psoriasis se puede presentar en cualquier etapa de la vida, más comúnmente entre los 15 y 35 años de edad, algunos factores que la desencadenan o la agravan son traumatismos físicos, reacciones de intoxicación por luz ultravioleta al sol, activación de reacciones inmunológicas del organismo (debido a infecciones por bacterias, virus o vacunas), medicamentos o estrés emocional (Asociación Mexicana contra la Psoriasis, 2014), (Janssen-Cilag S.A., 2015). En condiciones normales, las células de la piel, los queratinocitos, se dividen por mitosis dando lugar a células nuevas que maduran y ascienden a estratos superiores hasta llegar al estrato córneo, en donde completan su queratinización, todo esto en un periodo aproximado de 28 días a partir del nacimiento en el estrato basal, mueren y se desprenden de la piel. En la piel psoriásica, este proceso se da entre 3 y 6 días, de esta manera los queratinocitos se van acumulando y la piel se va haciendo hiperplásica, manifestándose clínicamente con placas gruesas y constante descamación (Figura 4).

El mecanismo desencadenante de las lesiones de psoriasis está mediado inmunológicamente por los linfocitos T, pues la activación de un infiltrado inflamatorio dérmico y epidérmico como sucede en la psoriasis, requiere un reclutamiento de leucocitos en la periferia, dados por la activación del antígeno de los linfocitos T de la dermis, que promueve la proliferación de los queratinocitos en la zona de lesión, la acumulación de neutrófilos y la inflamación en general de la psoriasis (Ilustración 4) (Blondet, 2008).

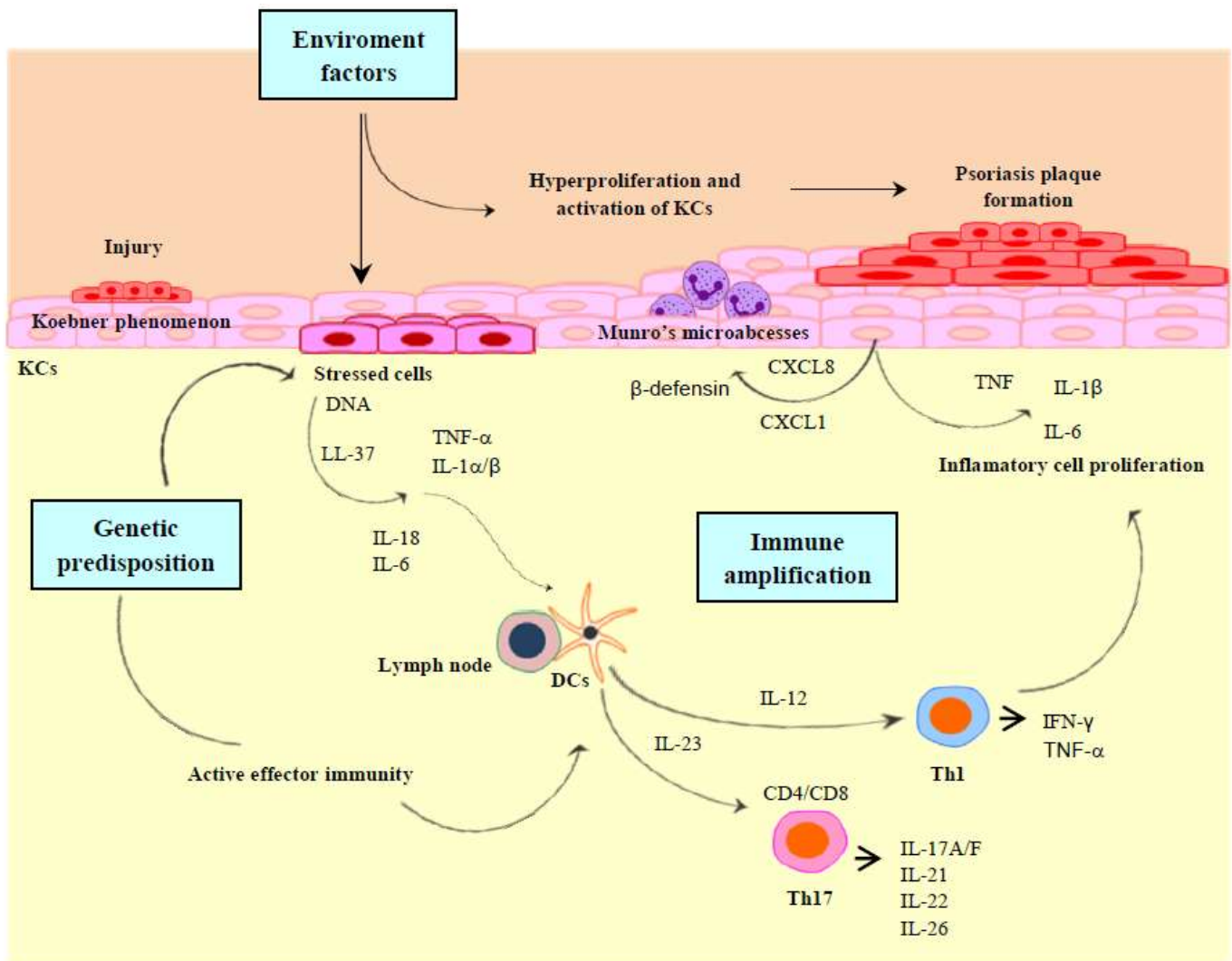


Ilustración 4. Una hipótesis etiopatogénica de la psoriasis. (Tomado de Díaz-Murillo V, 2016). El estrés medioambiental, la presencia de traumas físicos o infecciones en individuos genéticamente predispuestos activa a los queratinocitos (KC) y las células dendríticas (DCs). Estas últimas migran a los ganglios linfáticos que drenan el sitio de la lesión y promueven la diferenciación de los linfocitos T en linfocitos Th1 y Th17. Estos linfocitos comienzan a liberar citosinas y quimiocinas (INFγ, TNF, IL17, IL-22, IL-26) que interactúan con los queratinocitos induciendo la liberación de mayor cantidad de citosinas y quimiocinas (IL-6, IL-8) amplificando el circuito inflamatorio. Estos mediadores incrementan la actividad mitótica de los queratinocitos promoviendo la formación de las placas. Como respuesta a estos cambios, los neutrófilos son reclutados y existe una mayor migración de linfocitos hacia la piel. Las interacciones complejas entre los queratinocitos, las células dendríticas y los linfocitos parecen ser las responsables de la perpetuación de la enfermedad.

2.3.1 TIPOS DE PSORIASIS

La psoriasis es una enfermedad de morfología, distribución y gravedad variable, es una enfermedad que puede estar localizada o generalizada e incapacitante. La morfología puede variar de pequeñas pápulas en forma de lágrima, a pústulas y eritemas generalizados. Puede presentarse en forma aguda, con una progresión rápida y generalizada, o crónica con placas estables (Langley, et al., 2005).

2.3.1.1 PSORIASIS EN PLACAS:

Es la forma más común de psoriasis (90%). “Placa” es el nombre que se emplea para describir las manchas o lesiones eritematosas en la piel, las que se observan en forma oval, redondeada o numular (en forma de moneda), de color rojo y engrosada, en muchos casos aparecen cubiertas de escamas plateadas (Figura 5). Las lesiones pueden comenzar como máculas (planas de 1 cm de diámetro) o como pápulas y se van extendiendo en la periferia hasta formar placas de varios centímetros bien definidas rodeadas por piel no lesionada de apariencia normal. Las placas son a menudo dolorosas y causan picazón; se extienden gradualmente hacia el exterior y la parte central tiende a sanar dándole el aspecto de un anillo (anillo de Woronoff) (Langley, et al., 2005), (Janssen-Cilag S.A., 2015).



Ilustración 5. Psoriasis en placas. Tomada de:
<http://emedicine.medscape.com/article/1108072-overview>.

La psoriasis en placa ha sido subdividido de acuerdo a los sitios anatómicos afectados y las variaciones fenotípicas como: psoriasis inversa, la psoriasis del cuero cabelludo, psoriasis de uñas, sebo-psoriasis y psoriasis palmo-plantar.

Psoriasis inversa

También conocido como nombre de la psoriasis intertriginosa o psoriasis flexural. Se caracteriza por la presencia de placas delgadas, poco escamosa y bien definidos que afectan sólo a la doblez de la piel (Griffiths, et al., 2007). Se localiza en axilas, las ingles, por debajo de las mamas y en los pliegues alrededor de los genitales y glúteos (Janssen-Cilag S.A., 2015). Este tipo de psoriasis está sujeto a la irritación causada por el roce y la sudoración debido a su ubicación en los pliegues de la piel y las zonas sensibles. Puede causar más problemas en personas con sobrepeso y aquellos con profundos pliegues de la piel (Canadian Dermatology Association, 2009).

Psoriasis del cuero cabelludo

En general, se considera que el cuero cabelludo es el más afectado por el área de la psoriasis en placas. A menudo es la primera área afectada por la enfermedad. Curiosamente, el logro del cuero cabelludo rara vez excede de la línea del cabello más allá de 2 cm. Clínicamente, las lesiones del cuero cabelludo se caracterizan por la presencia de eritema, placas escamosas claramente definidas, cubierta con escamas plateadas gruesas. Por lo general, se encuentran alrededor de las orejas y en la región occipital (Griffiths, et al., 2007).

Psoriasis de uñas

La psoriasis de uñas o psoriasis ungueal puede presentarse en pacientes con psoriasis en placa, pero también puede aparecer como una forma aislada y ocurrir en ausencia de la esclerosis cutánea. Es más común en manos que en pies (Ilustración 6) (Janssen-Cilag S.A., 2015). Cada una de las estructuras que forman la placa de la uña puede verse afectada, ya sea la matriz o el lecho ungueal, o ambas (Salomon, et al., 2003), (Orellana-Arauco, et al., 2012). Este tipo de psoriasis puede estar asociada con engrosamiento, la depresión, la decoloración y el desmoronamiento de la uña (Rich & Scher, 2003).

Sebo-psoriasis

La psoriasis sebácea es un tipo de psoriasis en placas que se caracteriza por su parecido a la dermatitis seborreica, se ubica en cara, especialmente en los pliegues nasolabiales y morfológicamente se observa como lesiones rojas, finas y bien definidas de aspecto graso (Griffiths, et al., 2007).

Psoriasis palmo-plantar

La psoriasis palmo-plantar afecta las palmas de las manos y las plantas de los pies, con una incidencia del 17% de los pacientes con psoriasis (Kumar, et al., 2002). Puede tomar dos formas, a menudo se observan en el mismo individuo. La primera aparece como una psoriasis en placas localizadas, psoriasis vulgaris similar a la presente en el resto del cuerpo. Las lesiones están bien delimitadas, eritematosas y cubiertas con una gruesa capa de escamas (Ilustración 7). La segunda forma es conocida como la psoriasis pustulosa palmoplantar, que se caracteriza por la presencia de placas eritematosas salpicadas de pústulas, a menudo intraepidérmicos recalcitrantes al tratamiento (Canadian Dermatology Association, 2009). La psoriasis pustulosa palmoplantar es visto como un trastorno genético distinto, que puede ocurrir independientemente o en co-morbilidad con psoriasis en placa (Griffiths & Barker, 2007).



*Ilustración 6. Psoriasis de uñas
Langley, et al., 2005.*



*Ilustración 7. Psoriasis palmo-plantar
Langley, et al., 2005.*

2.3.1.2 OTROS TIPOS DE PSORIASIS:

Eritrodérmica

La psoriasis eritrodérmica se caracteriza por una erupción cutánea aguda o subaguda difusa y lesiones inflamatorias psoriásicas rojas que a menudo se extiende hasta el 90% o más de la superficie del cuerpo y que va acompañada por una intensa descamación dejando poca o ninguna parte del cuerpo con piel normal. La psoriasis eritrodérmica se considera una enfermedad grave y poco común (Canadian Dermatology Association, 2009), (Janssen-Cilag S.A., 2015).

Este tipo de psoriasis puede causar que los pacientes posean varios trastornos de la regulación de la temperatura, trastornos cardiovasculares, sensación de llamaradas de calor en la piel y/o fiebre, lo que dificulta en gran medida su calidad de vida. Además, estos pacientes pueden presentar riesgo significativo de deshidratación y por ello requerir hospitalización (Roenigk & Maibach, 1985).

Psoriasis en gotas

La psoriasis en guttata o en gotas se manifiesta como una erupción aguda de pequeñas pápulas en el tronco, las extremidades, la cara y veces en el cuero cabelludo (Roenigk & Maibach, 1985), (Janssen-Cilag S.A., 2015). Las zonas de fricción son a menudo afectadas: parte inferior del abdomen, espalda baja, antebrazos, pecho. En cerca de dos tercios de los casos, las gotas en los brotes son provocados por estreptococo (Canadian Dermatology Association, 2009).

Psoriasis pustulosa:

La psoriasis pustulosa generalizada o extendida también se conoce como psoriasis de von Zumbusch. Se caracteriza por la formación de pústulas, que son lesiones en la piel y mucosas donde se acumula pus, resultado de la exageración

del fenómeno de la exocitosis de los neutrófilos que caracterizan psoriasis; Clínicamente, es en forma de pústulas planas, de color blanco amarillento (amicrobiennes), con una tendencia a la coalescencia. Se localiza en zonas locales como pies y manos (Canadian Dermatology Association, 2009), (Janssen-Cilag S.A., 2015).

Artritis psoriática

La artritis psoriática es una artritis inflamatoria asociada a la psoriasis que afecta entre al 5-30% de los pacientes, con serología negativa al factor reumatoide. Aun no se sabe la patogenia de ambas enfermedades, pero tanto en la piel como en las articulaciones se produce una reacción crónica caracterizada por el incremento del número de vasos sanguíneos, la infiltración de linfocitos T, macrófagos y neutrófilos activados. Su diagnóstico precoz es importante porque la afectación articular puede ser irreversible (Gonzalez, et al., 2012), (Janssen-Cilag S.A., 2015).

2.3.2 NIVELES DE GRAVEDAD

Clínicamente, la determinación de la gravedad de la psoriasis incluye una evaluación objetiva de la extensión y síntomas, así como una evaluación subjetiva del impacto de la enfermedad en la calidad de vida de los pacientes. Entre las medidas objetivas estandarizados existentes se encuentran las de área de superficie corporal (BSA) y el índice de área y gravedad de la psoriasis, conocido como PASI, mientras que el índice de calidad de vida en dermatología “Dermatology Life Quality Index” (DLQI) y la escala SF-36, las que se utiliza para evaluar la calidad de vida de los pacientes (Canadian Dermatology Association, 2009).

Hasta el momento, no existe un consenso sobre los criterios de definición de la gravedad de la psoriasis o en la evaluación del éxito terapéutico. Más comúnmente se utilizan las herramientas utilizadas en ensayos clínicos y en muchos casos son poco adecuados para la práctica clínica (Gottlieb, et al., 2005). Los pacientes con un BSA >5% presentan psoriasis de moderada a grave. Se considera la enfermedad como "grave" si cumple con los criterios de la “regla de 10”: PASI $\geq$ 10, BSA $\geq$ 10% o una puntuación >10 DLQI (Puig, et al., 2009), mientras que otros establecen un criterio único BSA $\geq$ 20% (Finlay, 2005), (Tanew, et al., 1991). Por lo tanto, hay un consenso a nivel internacional acerca de que es imprescindible establecer nuevos estándares que se centren en los pacientes con el fin de evaluar la gravedad de la enfermedad y el éxito terapéutico (Krueger, et al., 2001) (Puig, et al., 2009).

2.3.3 ESTRÉS OXIDATIVO Y PSORIASIS

Se conoce como estrés oxidativo al desequilibrio entre la producción endógena de las especies reactivas del oxígeno y la capacidad de nuestro organismo de tener defensas antioxidantes, ya sea debido a una defensa defectuosa o bien por una mayor condición pro-oxidante que puede ser potencialmente perjudicial (Berger, 2006).

La piel proporciona una interfaz importante entre el medio ambiente y el cuerpo, por tanto, está continuamente expuesta a una amplia gama de contaminantes ambientales químicos y físicos (Athar, 2002) que conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno (Okayama, 2005). Para hacer frente a los efectos negativos de estos agentes oxidantes, la piel está equipada con un sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático, cuya función es mantener el equilibrio redox intracelular. Las enzimas de la piel antioxidantes están representadas por la enzima superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. Entre las defensas antioxidantes no enzimáticas se incluyen los antioxidantes de bajo peso molecular, como el glutatión reducido, ácido ascórbico, carotenoides y α -tocoferol (Berger, 2006).

Las investigaciones científicas refieren que un insuficiente sistema de antioxidante es también causa de la patogenia de la psoriasis. En las últimas dos décadas, se ha investigado la relación entre las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y la psoriasis, donde se demuestra la presencia de estrés oxidativo en pacientes (García-Pérez, et al., 2010).

Varios estudios experimentales han confirmado interrupciones a los mecanismos de protección antioxidante en la piel, eritrocitos y plasma de los pacientes con psoriasis (Utas, et al., 2002), (Baz, et al., 2003), (Yildirim, et al., 2003). De hecho, especies reactivas como el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido parecen ser generados en la psoriasis bajo la acción de la xantina oxidasa, una enzima que exhibe altos niveles de actividad dentro de las placas (Kizaki, et al., 1977). Además, el aumento de la producción de TNF- α dentro de las lesiones también puede contribuir a la producción de H_2O_2 en la psoriasis (Young, et al., 2008).

Los estudios experimentales también han demostrado que la piel psoriásica se caracteriza por un aumento significativo del contenido de dialdehído malónico, que muestra un estado avanzado de la peroxidación lipídica (Okayama, 2005) (Utas, et al., 2002). La peroxidación de lípidos, en los queratinocitos psoriásicos, parece ser una de las causas de la disminución de la fluidez de la membrana que se encuentran en la enfermedad (Simonetti, et al., 1996) que juegan un papel importante en la homeostasis celular y reorganización lípidos, como resultado de los cambios de temperatura (Gommans, et al., 1979). Además, parece que los productos de la peroxidación de lípidos son capaces de inhibir la enzima adenil ciclasa (Popov & Lewin, 1991), mientras que la disminución de los niveles de

cAMP en los queratinocitos, que está conectado a hiperproliferación encuentra en la psoriasis.

Aunque estos estudios han demostrado la presencia de estrés oxidativo en pacientes, aún existen muchas incertidumbres en la literatura científica que permitan establecer vínculos entre el estrés oxidativo y otros trastornos que están presentes en la enfermedad. Se ha sugerido que el tratamiento antipsoriático con antioxidantes puede ser parte de una terapia más específica y eficaz (Young, et al., 2008). Sin embargo, aún no se han identificado los beneficios reales de este tipo de medicamentos para la enfermedad.

2.3.4 TRATAMIENTOS ANTIPSORIASICOS ACTUALES

Aunque todavía no hay cura para la psoriasis, existen diversos tratamientos encaminados al alivio de síntomas que están disponibles para los pacientes. La elección del tratamiento dependerá de una variedad de factores, como la morfología de las placas, la extensión y localización de las lesiones, la respuesta a las terapias anteriores, así como la naturaleza de los factores desencadenantes y las comorbilidades presentes en los pacientes (Lebwohl & Ali, 2001). Básicamente son cuatro las estrategias terapéuticas para tratar la psoriasis: 1) tratamientos tópicos, 2) la fototerapia, 3) los tratamientos sistémicos y 4) los tratamientos biotecnológicos.

Los tratamientos tópicos más utilizados son: a) los corticosteroides; b) los análogos de la vitamina D3; c) los retinoides y; d) el ácido salicílico. Los corticosteroides se han convertido en el tratamiento tópico de elección de pacientes con psoriasis leve (Stowd, et al., 2009). Los corticosteroides disminuyen los síntomas de la psoriasis por su acción inmunosupresora, antiinflamatoria, antiproliferativa y vasoconstrictora. Los análogos de la vitamina D3 y los retinoides tópicos (tazaroteno) regulan la proliferación y diferenciación de los queratinocitos y también pueden inhibir la actividad de los linfocitos T (Duvic, et al., 1997). El ácido salicílico es conocido por sus efectos queratolíticos. La fototerapia se utiliza para los pacientes con psoriasis moderada y/o grave que no responden satisfactoriamente a los agentes tópicos. Hay dos tipos de fototerapia: la terapia PUVA y fototerapia ultravioleta (UVB). La terapia PUVA incluye varias técnicas que utilizan el 5 u 8-metoxipsoraleno para sensibilizar a las células de la piel frente a los efectos de los rayos ultravioleta (320-400nm). Tanto la fototerapia UVB como la PUVA terapia causan una rápida reducción de las poblaciones celulares dérmicas y epidérmicas que participan en la patogénesis de la psoriasis incluyendo linfocitos T, macrófagos y células dendríticas (Erkin, et al., 2007).

Los tratamientos sistémicos más utilizados son los retinoides orales, el metotrexato y la ciclosporina. El metotrexato, considerado como un antimetabolito, se ha utilizado en el tratamiento de la psoriasis por sus propiedades

antiproliferativas, pero hoy en día también se le reconocen sus efectos inhibitorios sobre la activación de linfocitos T y B y la producción de citocinas proinflamatorias (Fairbanks, et al., 1999). Los retinoides orales, como la acitretina, disminuyen el grosor, el enrojecimiento y la descamación de las placas mediante la modulación de la proliferación y la diferenciación de las células epidérmicas (Monfrecola & Baldo, 2009). La ciclosporina es un inhibidor de la calcineurina utilizado como un inmunosupresor en el tratamiento de psoriasis. La inhibición de la calcineurina implica la inhibición de la transcripción de genes asociados con la activación de los linfocitos T. De esta manera, el medicamento previene la activación de los linfocitos T y la producción subsecuente de citocinas proinflamatorias (Ghoreschi, et al., 2003).

Recientemente, nuevos tratamientos biotecnológicos están disponibles para el tratamiento de psoriasis. Estos fármacos tienen como diana farmacológica elementos específicos del sistema inmune y generalmente son utilizados en el caso de pacientes resistentes a tratamientos sistémicos convencionales. El objeto de estos tratamientos incluye: a) la inhibición de la activación y del número de células T patógenas; b) la inhibición de citocinas proinflamatorias y/o sus receptores implicados en la psoriasis (IL-12, IL-23, IL-17, TNF- α). Dentro de este grupo se encuentra el alefacept, una proteína de fusión humana, que bloquea la interacción de las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T, promoviendo la apoptosis de estos (Chaarani & Lebwohl, 2010).

Dos tipos de fármacos biotecnológicos anti-TNF-alfa se han utilizado para el tratamiento de la psoriasis: anticuerpos monoclonales (adalimumab e infliximab) y una proteína de fusión (etanercept). Estas terapias han demostrado una notable eficacia terapéutica en comparación con los tratamientos convencionales y terapias biotecnológicas dirigidas a la inhibición los linfocitos T, lo que ha demostrado la importancia del TNF- α en la patogénesis de la psoriasis (Leon, et al., 2007).

Uno de los problemas que limita el uso a largo plazo de los tratamientos antipsoriásicos disponibles está relacionado con su toxicidad. Esta incluye: nefrotoxicidad (ciclosporina A), hepatotoxicidad (metotrexato), cáncer de piel (fototerapia), mielosupresión (hidroxiurea), teratogénesis (retinoides orales), inmunosupresión, cáncer y tuberculosis (biotecnológicos) (Pfundt, et al., 2000). Además, la eficacia de estos tratamientos es incierta en muchos casos, lo que contribuye a una gran insatisfacción de los pacientes con las terapias disponibles y ha motivado a que la industria farmacéutica esté cada vez más interesada en el desarrollo de nuevos tratamientos farmacobiológicos, los que pueden ser derivados de productos naturales existentes (García-Pérez, et al., 2010).

2.3.5 POLIFENOLES ESTUDIADOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA PSORIASIS

La inflamación es un acontecimiento de la piel en respuesta a la exposición de estímulos ambientales y endógenos, daño accidental que se encuentra asociada a la patogénesis de patologías cutáneas, como la psoriasis. La inflamación crónica es un proceso multifactorial, nocivo y complejo, difícil de combatir. Gran cantidad de estudios documentan que en el proceso de inflamación participan especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, llevando a la investigación de sustancias activas de extractos de plantas, principalmente polifenoles, por su capacidad de eliminar radicales libres debido a su carácter antioxidante (Kostyuk, et al., 2010).

Picea mariana es un árbol utilizado por los nativos del norte América para tratar de manera tópica la inflamación de la piel. Se ha demostrado científicamente que el extracto acuoso, muy rico en compuestos fenólicos como el resveratrol posee propiedades antioxidantes comparables a las del extracto comercial Oligopin® (García-Pérez, et al., 2012). La fracción acetato de etilo fue utilizada en un modelo in vitro empleando queratinocitos psoriásicos estimulados con factor de necrosis tumoral (TNF), mostrando un gran potencial antiinflamatorio, incluso superior al de la dexametasona (García-Pérez, et al., 2014).

Los polifenoles del extracto de cocoa tienen efectos antioxidantes y anti-inflamatorios, que se han probado para la inhibición de TNF- α , una citoquina que juega un rol importante en la inflamación de psoriasis y otras patogenias (Kima, et al., 2010). Un polifenol del té verde se ha probado en piel psoriásica de ratón, con efectos benéficos para la piel, donde es capaz de inducir la expresión de la caspasa 14, que está directamente implicada en la diferenciación de las células epiteliales (Hsu, et al., 2007).

2.4 IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS TOXICOLOGICOS PRECLÍNICOS EN EL DESARROLLO FARMACEUTICO

El desarrollo de nuevos fármacos es un camino largo de experimentación, que impone la aplicación de estudios preclínicos *in vivo* o *in vitro* que son diseñados para obtener la información necesaria para decidir si se justifica la experimentación consiguiente de estudios clínicos en humanos (Ramírez-Herrera & Soto-Ruíz, 2015).

Una parte importante de la preclínica experimental durante las etapas de desarrollo de un nuevo medicamento es la preclínica toxicológica. Este tipo de estudios permiten identificar la toxicidad en células, órganos o tejidos, estudiar el mecanismo de acción tóxico y valorar la relación riesgo/beneficio, un parámetro extremadamente importante que permite a las entidades reguladoras, encargadas de la aprobación de nuevos medicamentos, tener los elementos necesarios para una posterior aprobación de su uso y venta en el mercado (Gámez, 2007). Si se

considera la famosa frase de Paracelso “solo la dosis hace el veneno”, puede entenderse que no existe, en términos estrictos, un medicamento completamente inocuo, ya que todos tienen la potencialidad intrínseca de producir daño (Universidad de Granada, 2015).

La relación beneficio-riesgo es, en términos generales, el balance que existe entre los riesgos y los beneficios de una determinada terapia, los que se comparan con otras opciones terapéuticas y donde se considera incluso la opción de no utilizar ningún tratamiento. El riesgo es entendido como la probabilidad de que se produzca un efecto nocivo derivado de la utilización del fármaco, mientras que el daño es la manifestación real de este daño. El beneficio, por su parte se manifiesta en la eficacia del medicamento en las condiciones de uso reales (Maciá, 2011).

Los estudios preclínicos toxicológicos evalúan el potencial de que un candidato a medicamento o sus metabolitos destruyan o lesionen células y órganos, causen cáncer e incluso ocasionen problemas relacionados con la reproducción, como defectos congénitos o esterilidad. La información derivada de estos estudios es de crucial importancia. Permite que los investigadores calculen una posología segura para los seres humanos en ensayos clínicos ulteriores de fase I. La evaluación preclínica toxicológica, que comprende la utilización modelos *in vivo* e *in vitro* engloba ensayos de toxicidad aguda (una sola exposición), toxicidad subcrónica y crónica, hasta estudios de genotoxicidad, teratogénesis y carcinogénesis. Las consideraciones para los ensayos de toxicidad así como la valoración armónica de los resultados son debatidos en las Conferencias Internacionales de Armonización (ICH) (Gámez, 2007).

Los animales de experimentación son la unidad fundamental de los ensayos toxicológicos preclínicos *in vivo*, su empleo está regulado según los requerimientos del estudio y tomando en cuenta principios éticos, respaldados por un protocolo confeccionado según el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio y protocolos específicos del estudio (Gámez, 2007), además de que debe cumplir con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 que se refiere a las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” para los estudios con animales. México es uno de los 34 países que forman la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE/OECD por sus siglas en inglés), que desde 1961 convoca a los gobiernos a trabajar en conjunto para promover políticas que mejoren el bienestar económico y social de las personas alrededor del mundo. Entre los temas que aborda la OCDE se encuentra el de Ciencia y Tecnología, con quías internacionales estandarizadas para realizar estudios de toxicidad (OECD. , 2015).

2.4.1 ESTUDIOS DE TOXICIDAD AGUDA

El estudio de toxicidad aguda evalúa la toxicidad inducida por un fármaco, droga o compuesto sujeto como el resultado de la administración de altas dosis, ya sea por

dosis única o repetida en un intervalo no mayor de 24h, brindando información sobre la toxicidad intrínseca del producto y el posible riesgo de su exposición aguda, además de aportar información para la selección de los niveles de dosis para estudios subcrónicos (Gámez, 2007). Para la realización de un estudio de toxicidad aguda, hay que tener en cuenta el tipo de producto y la posible vía por la que el hombre lo puede absorber (oral, dérmica, inhalatoria, ocular, parenteral, etc.).

Durante muchos años, los estudios de toxicología oral aguda tenían como propósito la búsqueda de la dosis letal media (DL50), es decir, la dosis que causaba la muerte en el 50 % de los animales. La OCDE desde el 2001 no acepta los estudios agudos clásicos como parte de la documentación de registro de medicamentos (Gámez, 2007) y sustituyó en ese año el ensayo de la determinación de la Toxicidad oral aguda (directriz 401) aprobado en 1987 donde se evaluaba la DL50 (dosis letal media), por sus tres alternativas: directriz 420: Toxicidad oral aguda - método de dosis fija; directriz 423: Toxicidad oral aguda - Método de las Clases de Toxicidad Aguda y directriz 425 Toxicidad oral aguda – Procedimiento Arriba y abajo. La dosis de 5000mg/kg fue un nivel aceptado durante muchos años, pero desde el 2001 se ha reducido a 2000mg/kg (Gámez, 2007), ya que se considera que, si después de 2000 mg/kg no existe toxicidad evidente, el potencial intrínseco tóxico de la molécula es lo bastante bajo como para exponer a un mayor número de animales de experimentación a una dosis mayor que solo generaría sufrimiento para ellos.

2.4.2 ESTUDIOS DE TOXICIDAD A DOSIS REPETIDA

Los estudios de toxicidad a dosis repetida, a diferencia de los estudios de toxicidad aguda, emplean la administración repetida de la sustancia de ensayo. Los estudios de toxicidad a dosis repetida pueden dividirse en estudios de toxicidad subcrónica y toxicidad crónica.

La toxicidad subcrónica es la toxicidad acumulativa de la sustancia administrada o de sus metabolitos como resultado de su administración diaria, durante parte del ciclo de vida de un organismo, que generalmente no excede del 10% (Ramirez-Herrera & Soto-Ruíz, 2015), (Gámez, 2007). El estudio permite definir la dosis con la que no se aprecia toxicidad relacionada con la sustancia administrada (NOEL), así como la dosis máxima tolerada (DMT) y brinda una valiosa información sobre los órganos dianas constituyendo la base para la selección de las dosis a evaluar durante los estudios crónicos (Gámez, 2007).

Los estudios de toxicidad crónica se realizan con el objetivo de determinar el potencial toxicológico de una sustancia luego de una administración prolongada y repetida (Gámez, 2007), durante la mayor parte de vida de un organismo, generalmente más del 50% (Ramirez-Herrera & Soto-Ruíz, 2015). Para el análisis de algún posible medicamento, el estudio debe ser realizado en al menos dos

especies, una roedora y una no roedora. El diseño de los estudios de toxicidad crónica se encamina a detectar los efectos tóxicos generales, incluidos los neurológicos, conductuales, bioquímicos, fisiológicos y patológicos como resultado de la acción prolongada de la sustancia administrada o sus metabolitos. Con estos estudios es posible determinar la relación dosis-respuesta y la NOEL. La dosis a emplear no debe exceder de 1000mg/kg/día, debe ser adecuada en base a los hallazgos en el estudio de toxicidad subcrónica precedente, ya que este tipo de ensayos resultan de alto costo (Gámez, 2007).

En los estudios de toxicidad a dosis repetidas por vía oral el método subcrónico más utilizado se basa en la directriz 407 de la OCDE donde se da una dosis repetida a animales de experimentación durante 28 días, lo que permite detectar la presencia de signos y síntomas de toxicidad en una primera etapa, posteriormente se realiza un estudio histopatológico para una mejor evaluación, así como la medición de parámetros hematológicos y bioquímicos para la determinación de la alteración de biomarcadores que pudieran indicar la presencia de toxicidad. El estudio crónico de 90 días por vía oral más utilizado se basa en la directriz 408 de la OCDE, y se considera como un ensayo más sensible por el tiempo de exposición y el número de animales empleados (Repetto, et al., 2014).

2.4.3 ESTUDIOS ALTERNATIVOS DE TOXICIDAD

Los métodos utilizados en la experimentación toxicológica están en continuo progreso y cambio, pues los investigadores están permanentemente en la búsqueda de posibles alternativas que mejoren la calidad de su trabajo con animales de experimentación. La necesidad en cuanto a la evaluación de la seguridad de los medicamentos, han impulsado una gran área de métodos alternativos toxicológicos al empleo de animales de experimentación (Repetto, et al., 2014). La toxicología alternativa nace de la presión de los grupos ecologistas y del público de disminuir y eliminar el uso de animales de experimentación. De hecho, muchos de estos grupos sostienen que los animales deben ser retirados completamente del desarrollo de nuevos medicamentos, aún con el costo de perder la información científica que ellos aportan y que en la actualidad es imposible obtener por otras vías. La toxicología Alternativa a la Experimentación Animal no solo se sustenta en la sustitución de los animales de experimentación de la experimentación científica, sino que se fundamenta el Principio de las Tres R's (refinamiento, reducción y reemplazo), el cual fue definido en 1959 en el libro "The principles of Humane Experimental Technique" por Russel y Burch. El "refinamiento" se refiere básicamente a toda forma de disminución en cuanto a la incidencia y severidad de los procedimientos experimentales aplicados a animales de experimentación. La "reducción", como su nombre lo indica, se relaciona con el uso de métodos y herramientas que permitan la reducción del número de animales de un estudio sin afectar la calidad de los resultados, mientras que el "reemplazo" estipula la sustitución de los animales de experimentación por organismos

inferiores o células y tejidos en los que no exista sistema nervioso y por lo tanto la posibilidad de tener sensaciones como el dolor (Russell & Burch, 1959).

La ventaja principal de los métodos toxicológicos alternativos radica en el respeto a las consideraciones éticas alrededor del uso de animales de experimentación, además de que pueden generar información específica relacionada con mecanismos de acción, que no se puede conseguir en muchos casos con modelos *in vivo* (Meneau-Hernández, 2014). Sin embargo, se señalan como desventajas el mayor grado de simplicidad, la imposibilidad de evaluar reacciones de reversibilidad, la duración de los ensayos que no refleja las condiciones reales de uso, la imposibilidad de conseguir administraciones repetidas y el grado de uniformidad de las respuestas que no tiene en cuenta las variaciones interindividuales (Meneau-Hernández, 2014). En modelos animales, el hecho de contar con un organismo completo supone la presencia de mecanismos reguladores y compensatorios de diversas funciones, los que no se presenta en modelos más simplificados. Lo anterior implica una mayor dificultad cuando se extrapolan resultados a humanos a partir de modelos como los *in vitro*.

A pesar de estas limitaciones, existen algunos métodos toxicológicos alternativos aceptados por las entidades regulatorias, los que han sufrido un proceso de validación, entendiéndose como tal al proceso basado en principios científicos que demuestren fiabilidad y relevancia de un ensayo para un determinado propósito (OECD, 2005). Una vez que un método ha sido científicamente validado, el mismo debe pasar por el proceso de aceptación regulatoria y adopción como directriz, lo que le confiere validez para su aplicación en estudios de valoración toxicológica. La tabla 2 muestra algunos métodos alternativos aceptados internacionalmente (Meneau-Hernández, 2014).

Tabla 2. Métodos alternativos aceptados internacionalmente para la valoración de la toxicidad.

Método	Ensayo	Aceptación regulatoria
Toxicidad aguda oral		
Método de las clases	<i>in vivo</i>	OECD TG 423 (2001)
Método de la dosis fija	<i>in vivo</i>	OECD TG 420 (2001)
Procedimiento arriba-abajo	<i>in vivo</i>	OECD TG 425 (2006)
Ensayo de respuesta de queratinocitos normales humanos al rojo neutro (NHK NRU)	<i>in vitro</i>	OECD GD 129 (2010)
Ensayo de respuesta al rojo neutro Balb/c 3T3	<i>in vitro</i>	OECD TG 129 (2010)
Toxicidad aguda inhalación		

Método de las clases	<i>in vivo</i>	OECD (TG 436 (2009), GD 153 (2011))
Penetración o absorción dermal		
Métodos <i>in vivo</i> para evaluar la absorción cutánea	<i>in vitro</i>	OECD (TG 428 (2004), DG 28 (2004), Notas no. 156)
Estudio de mecanismos endocrinos		
Ensayo de activación transcripcional para agonistas de receptores (Rs) estrogénicos	<i>in vitro</i>	Actualizada OECD TG 435 (2012)
Esteroidogénesis (H295R línea celular humana)	<i>in vitro</i>	OECD TG 456
Método de transactivación del R estrogénico DG1Luc para identificar agonistas de los Rs estrogénicos	<i>in vitro</i>	OECD TG 457 (2012)
Corrosión ocular		
Ensayo de opacidad y permeabilidad córnea bovina	<i>ex vivo</i>	OECD (Revisado TG 437 (2012), GD 160)
Método del ojo aislado de pollo	<i>ex vivo</i>	OECD (Revisado TG 438 (2012), GD 160)
Liberación de Fluoresceína	<i>in vitro</i>	OECD TG 460 (2012)
Evaluación del uso de analgésicos tópicos, analgésicos sistémicos y punto final en humanos	<i>in vivo</i>	Actualización OECD (TG 405 (2012), GD 19)
Estrategia de ensayo secuencial para irritación y corrosión ocular	<i>in vivo/</i> <i>ex vivo/</i> <i>in vitro</i>	Actualización OECD TG 405 (2012)
Irritación ocular		
Uso rutinario de analgésicos tópicos, analgésicos sistémicos y punto final en humanos	<i>in vivo</i>	Actualización OECD (TG 405 (2012), GD 19)
Estrategia secuencial de ensayo para irritación y corrosión ocular	<i>in vivo/</i> <i>ex vivo/</i> <i>in vitro</i>	Actualización OECD TG 405 (2012)
Genotoxicidad		
Ensayo de Ames	<i>in vitro</i>	OECD TG 471 (1997)
Ensayo de mutagenicidad celular	<i>in vitro</i>	OECD TG 476 (1997)
Ensayo de aberraciones cromosómicas	<i>in vitro</i>	Actualización OECD TG 473 (2012)
Ensayo de micro núcleos en células de mamíferos	<i>in vitro</i>	Borrador OECD TG 487 (2012), ICH (2011)
Ensayo de intercambio de cromátidas hermanas	<i>in vitro</i>	OECD TG 479 (1986)
Ensayo de síntesis no propagada de ADN	<i>in vitro</i>	OECD TG 482 (1986)

Ensayo de mutagenicidad en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>in vitro</i>	OECD TG 480 (1986)
Inmunotoxicidad/ Piel sensibilización		
Ensayo den nódulo linfático local	<i>in vivo</i>	Actualización OECD TG 429 (2010)
Nódulo Linfático Local LLNA: DA	<i>in vivo</i>	OECD TG 442A (2010)
Nódulo Linfático local: BrdU-ELISA	<i>in vivo</i>	OECD TG 442B (2010)
Fototoxicidad		
Captación del rojo neutro células 3T3	<i>in vitro</i>	OECD TG 432 (2004)

En la Norma Mexicana “NMX-R-019-SCFI-2011 Sistema armonizado de clasificación y comunicación de peligros de los productos químicos” en el apartado de Peligros para el medio ambiente se define como Toxicidad acuática aguda a la propiedad intrínseca de una sustancia de provocar efectos nocivos en los organismos acuáticos tras una exposición de corta duración. La toxicidad acuática aguda es determinada normalmente a partir de los resultados de la CL₅₀ en peces tras una exposición de 96h (Directriz 203 de la OCDE o equivalente), en crustáceos por la CE₅₀ tras una exposición de 48h (NMX-AA-087-1995-SCFI, NMX-AA-110-1995-SCFI o la Directriz 202 de la OCDE) y en algas por la CE₅₀ tras una exposición de 72 o 96h (Directriz 201 de la OCDE o equivalente). Estas tres especies se consideran representativas de todos los organismos acuáticos (Secretaría de Economía., 2011). Las sustancias clasificadas con los criterios de la Tabla 3 se considerarán como peligrosas para el medio ambiente acuático. Se considera como “productos químicos que representan un riesgo mínimo al ambiente” aquellos que tienen una CL₅₀, CE₅₀ y CEr₅₀ mayor a 1000 mg/L (Secretaría de Economía., 2011).

Tabla 3. Categorías de peligro para sustancias peligrosas para el medio ambiente acuático – Toxicidad Aguda.

Toxicidad Aguda			
Categoría	Peces	Crustáceos	Algas
Aguda 1 (extremadamente tóxico)	CL ₅₀ 96 h ≤ 1 mg/L	CE ₅₀ 48 h ≤ 1 mg/L	CEr ₅₀ 72 o 96 h ≤ 1 mg/L
Aguda 2 (altamente tóxico)	CL ₅₀ 96 h >1 y ≤ 10 mg/L	CE ₅₀ 48 h >1 y ≤ 10 mg/L	CEr ₅₀ 72 o 96 h >1 y ≤ 10 mg/L
Aguda 3 (prácticamente no tóxico)	CL ₅₀ 96 h > 10 y ≤ 100 mg/L	CE ₅₀ 48 h > 10 y ≤ 100 mg/L	CEr ₅₀ 72 o 96 h > 10 y ≤ 100 mg/l

Las larvas de *Artemia* sp han sido utilizadas en bioensayos toxicológicos alternativos por numerosos laboratorios de todo el mundo, y los resultados en la determinación de la LC_{50} han sido publicados para una serie de extractos naturales y químicos conocidos (Fernández-Calienes, et al., 2009), (Albuquerque-Sarmiento, et al., 2014). El ensayo de letalidad de *Artemia* sp se basa en la posibilidad de causar la muerte de larvas de este crustáceo cultivadas en el laboratorio. Este método fue propuesto por (Michael, et al., 1956) con el propósito de contar con una herramienta útil y sencilla para la determinación de toxicidad. En este método se determina el valor de la concentración letal media (CL_{50}) de compuestos y extractos en medio salino y permite conocer el potencial tóxico de las sustancias o extractos en estudio de manera preliminar, antes de realizar estudios en otros modelos animales (Michael, et al., 1956).

2.4.4 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS REALIZADOS A POLIFENOLES DEL GÉNERO QUERCUS

La literatura científica muestra que son insuficientes los estudios toxicológicos realizados a extractos del género *Quercus*. De hecho, solo dos estudios fueron encontrados. En el primero, se alimentaron varias cabras con ramas de *Quercus calliprinos* y otras especies de árboles ricas en taninos, en un estudio de toxicidad oral aguda. Las cabras no mostraron toxicidad en el análisis bioquímico sanguíneo con 10-23 g/Kg/día, demostrando que pueden adaptarse al entorno nutricional en una dieta rica en taninos sin efectos nocivos (Silanikove, et al., 1996). La segunda investigación consistió en la utilización de la especie *Quercus agrifolia*, la que contiene muchos compuestos polifenólicos considerados tóxicos para la mayoría de los mamíferos. Sin embargo, los roedores *Neotoma macrotis* incluyen hasta un 85% de roble en su dieta y *N. lepida* también incluye al roble en la dieta pero solo en áreas donde incide geográficamente con la especie *N. macrotis*. Se realizó un estudio en donde se incluyó el 70% de esta especie de encino en la dieta de ambos roedores, se analizaron 5 enzimas (citocromo P450, NAD(P)H/quinona oxidoreductasa, UDP-glucuronosiltransferasa (UGT), sulfotransferasa (SULT), y glutatión S-transferasa (GST)) y se demostró que no hay diferencia en la actividad de las enzimas debida a una dieta rica en *Q. agrifolia* (Haley, et al., 2007).

La carencia de estudios toxicológicos existentes con extractos provenientes del género *Quercus* limita la comprensión sobre la posible toxicidad que puede entrañar el uso de extractos y moléculas aisladas de este género para el desarrollo futuro de nuevos medicamentos para el tratamiento de la psoriasis.

3. JUSTIFICACIÓN

Con alrededor de 161 especies, México es el mayor centro de riqueza de encinos (*Quercus* sp.) en el continente americano. Se calcula que 109 de ellos son endémicos del país, es decir el 68% de los encinos del continente americano sólo se encuentra en México. En el caso específico de Michoacán, los encinos satisfacen 80% de las necesidades energéticas en forma de leña y carbón (Arizaga, et al., 2009). Después de los pinos (*Pinus* sp.), los encinos constituyen el recurso forestal más importante de México. Teniendo en cuenta lo anterior, se considera que los volúmenes de cortezas de esta especie son considerables, por lo que resultaría oportuno su estudio con el objetivo de proponer nuevas aplicaciones en el campo farmacéutico que permitan su aprovechamiento racional.

Una interesante vía para proponer nuevas aplicaciones a estos residuos es la obtención de extractos naturales, ricos en moléculas bioactivas como polifenoles, los cuales podrían utilizarse para el tratamiento de enfermedades que aún no tienen cura como la psoriasis. Los polifenoles son moléculas naturales, omnipresentes en el reino de las plantas, reconocidas como excelentes antioxidantes y antiinflamatorios que han demostrado su potente efecto anti-TNF alfa, superior a la dexametasona, en queratinocitos psoriásicos (García-Pérez, et al., 2014). A pesar de estos resultados alentadores, otros efectos farmacológicos y toxicológicos quedan por demostrar con el objetivo de convertir a estas moléculas en candidatos terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad. Este último aspecto constituye un elemento esencial en el desarrollo temprano de un producto antipsoriásico ya que se ha señalado que los nuevos candidatos terapéuticos antipsoriásicos deben demostrar su acción y seguridad sobre múltiples modelos biológicos y mecanismos implicados en la patogénesis de la enfermedad, debido al carácter pluricausal de la misma donde la expresión de más de 2000 genes está alterada (Shobaili, et al., 2012).

La revisión de la literatura muestra que casi todas las investigaciones relacionadas con la determinación de la composición polifenólica y las propiedades biológicas de especies pertenecientes al género *Quercus* se han realizado en especies europeas como *Quercus rubra* y *Quercus alba*, mientras que los estudios en especies mexicanas son prácticamente inexistentes.

La presente investigación propone la extracción, caracterización química, purificación y estudio de las propiedades antioxidantes y toxicológicas de extractos polifenólicos de especies de encino mexicanas con vistas a proponer nuevas aplicaciones en el desarrollo de productos farmacéuticos destinados al tratamiento de la psoriasis.

4. HIPÓTESIS

Un extracto polifenólico de cortezas de especies mexicanas pertenecientes al género *Quercus* presenta alto contenido de polifenoles, mostrando propiedades antioxidantes y un alto perfil de seguridad para el desarrollo de un nuevo candidato terapéutico antipsoriásico.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la composición química, así como las propiedades antioxidantes y toxicológicas de extractos polifenólicos de cortezas de especies mexicanas pertenecientes al género *Quercus* para establecer posibles aplicaciones en la formulación de nuevos productos naturales antipsoriásicos.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Realizar la colecta e identificación botánica de cortezas de tres especies mexicanas pertenecientes al género *Quercus* de importancia para la industria forestal del estado de Michoacán.
- 2.- Obtener 6 extractos brutos liofilizados utilizando dos protocolos de extracción: la extracción al agua caliente y la maceración con una mezcla de etanol/agua (90%).
- 3.- Determinar la composición química de los extractos obtenidos en términos de su contenido en fenoles totales, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas.
- 4.- Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos por métodos espectrofotométricos y compararla con la del extracto comercial Oligopin®.
- 5.- Realizar la purificación del extracto bruto más prometedor.
- 6.- Determinar la composición química del extracto purificado en términos de su contenido en fenoles totales, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas.
- 7.- Analizar las propiedades antioxidantes del extracto purificado.
- 8.- Determinar la toxicidad aguda del extracto purificado sobre nauplios de *Artemia franciscana* a partir de la determinación de la concentración letal 50 (CL₅₀).

7. METODOLOGÍA

7.1 COLECTA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LAS CORTEZAS

Se realizó la colecta de cortezas de tres especies de encino en una plantación forestal en Ciudad Hidalgo, Michoacán, México; también se colectaron ramas y hojas de cada encino para su identificación botánica. Estos tres encinos son comúnmente llamados “roble” (*Quercus scytophylla*), “escobillo” (*Quercus laurina*) y “blanco” (*Quercus crassifolia*). Las cortezas fueron lavadas, se fraccionaron en trozos de 5x5cm y fueron secadas a 40 °C en hornos durante 48 h. Posteriormente fueron pulverizadas en un molino de bolas y tamizadas con malla #40 (tamaño de partícula <0.4mm). Las cortezas pulverizadas fueron almacenadas en bolsas oscuras a temperatura ambiente, ya que la humedad excesiva, la incidencia del sol directo y el polvo atmosférico deterioran y disminuyen la calidad de la materia prima. El almacenamiento es crucial para la estabilidad de los compuestos, ya que el proceso de envejecimiento que ocurre en esta etapa pueden degradar considerablemente los metabolitos secundarios (Perez Bueno, 2015).

7.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS BRUTOS

7.2.1 EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN

Se pesaron 20g de corteza seca y pulverizada y se agregaron 200mL de etanol/agua 90:10 v/v. Se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm durante 24h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó un lavado con 200mL de etanol/agua 90:10 v/v y se filtró utilizando papel Whatman® No. 42. El filtrado fue liofilizado y protegido de la luz en frascos ámbar a 4 °C.

7.2.2 EXTRACCIÓN AL AGUA CALIENTE

Se pesaron 50 g de corteza seca y pulverizada y se realizó la extracción con 500ml de agua caliente (90 °C) con reflujo durante 1 h, se separó la fase acuosa y la corteza fue lavada con 500ml de agua caliente. El extracto acuoso fue filtrado con papel filtro Whatman No. 42, liofilizado y almacenado en frascos ámbar a 4 °C.

7.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA PRELIMINAR

Se realizó la caracterización química de los seis extractos, utilizando métodos espectrofotométricos, los que se compararon con el extracto comercial Oligopin® obtenido de cortezas de pino marítimo francés (*Pinus pinaster*) reconocido por su alto contenido de polifenoles bioactivos y sus excelentes propiedades antioxidantes.

7.3.1 CONTENIDO DE FENOLES TOTALES

Para determinar el contenido de fenoles totales se utilizó el método descrito por Scalbert *et al.* (1989). Este método se utilizó por su simplicidad, economía y facilidad. Para ello se prepararon soluciones de los extractos disueltos en una solución 50:50 (v/v) de H₂O/MeOH, se añadieron 2 ml de Na₂CO₃ [75g/L], 2.5 ml de reactivo de Folín-Ciocalteu y 500 µl de extracto. Posteriormente, se colocaron 10 min en un baño María a 50 °C y se midió la absorbancia a 750nm. El contenido total de fenoles se calculó por comparación con una curva de calibración usando ácido gálico.

7.3.2 CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES

Para establecer el contenido de flavonoides totales, se añadieron 2 ml del extracto en un tubo de ensayo (1 mg/ml) y una solución al 2% de AlCl₃, se agitó vigorosamente. Se incubó durante 1 hora a 20 °C y se leyó la absorbancia a 415nm. El contenido de flavonoides se determinó por comparación a una curva de calibración usando quercetina como estándar (Brighentea, et al., 2007).

7.3.3 CONTENIDO DE ACIDOS HIDROXICINÁMICOS

Para determinar el contenido en ácidos hidroxicinámicos, se utilizó la metodología descrita en la Farmacopea Europea para Fraxini folium (Folium, 2002). En un tubo de ensayo se añadió 1 ml del extracto (1 mg/ml), 2 ml de HCl (0.5 M), 2 ml de reactivo Arnow, 2 ml de NaOH (2.125 mol/L) y 3 ml de agua (Total= 10 ml) y la absorbancia se midió a 525nm. El contenido en ácidos hidroxicinámicos se realizó por comparación con una curva de calibración usando ácido clorogénico como estándar.

7.3.4 CONTENIDO DE PROANTOCIANIDINAS

Para definir el contenido de proantocianidinas se tomó 1 ml del extracto (1 mg/ml), al cual se le agregaron 6 ml de n-butanol-HCl en un tubo de ensayo, se añadieron 200 µl de reactivo de hierro a cada tubo de ensayo y se agitó (vortex) hasta homogeneización (≈ 5 s), se colocaron las muestras en el baño a 95 °C durante 50 min y se cubrió el baño con papel de aluminio. Para detener la reacción se utilizó hielo durante 10 min (se observó una coloración roja, que está relacionada a la presencia de proantocianidinas) y después se dejaron reposar 5 min a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 550 nm. El contenido en proantocianidinas se calculó por comparación con una curva de calibración usando como estándar cloruro de cianidina (Porter, et al., 1986).

7.4 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS EXTRACTOS BRUTOS

La capacidad de los extractos para captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno de relevancia biológica como: el anión superóxido, radical hidroxilo y peroxilo, óxido nítrico, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso se analizaron por métodos espectrofotométricos en comparación con el extracto comercial Oligopin® obtenidos de cortezas de pino marítimo francés (*Pinus pinaster*). La comparación de resultados fue realizada utilizando un análisis estadístico (ANOVA, seguido de un post-hoc test). En todos los casos se determinó la Concentración Efectiva 50 (EC₅₀), considerada como la concentración necesaria para inhibir en un 50% la reacción de oxidación. Mientras más pequeño este valor, los extractos son considerados más antioxidantes.

7.4.1 CAPACIDAD DE ATRAPAR RADICALES PEROXILO (ROO•)

La capacidad de capturar radicales peroxilo (ROO •) se determinó por el método descrito por López-Alarcón y Lissi (2005), para lo cual se prepararon 10 ml de extractos a diferentes concentraciones (entre 0.1 y 1.0 mg/ml) en una solución MeOH/H₂O 1/1 a partir de una solución madre. Se mezclaron 3 ml de la solución de pirogalol rojo ([30 µM] en tampón fosfato/etanol 70/30 v/v) con 300 µl de solución de los extractos de las diferentes concentraciones en tubos de ensayo, posteriormente se añadieron 50 µl de 2-azobis (2-metilpropionamida) dihidrocloruro (AAPH) [600 mM] para iniciar la reacción y se colocaron en baño María a 37 °C durante 2h, se midió la absorbancia a 540 nm. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 1 - [(A_{\text{extracto inicial}} - A_{\text{extracto final}}) / (A_{\text{control inicial}} - A_{\text{control final}})]$$

Donde:

A_{extracto inicial}: absorbancia de la solución de extracto sin AAPH (sustituir con 50 µL de agua destilada) y sin incubación.

A_{control inicial}: absorbancia testigo (es decir, sin extracto, por tanto, sustituir con 300 µl de MeOH/H₂O 1/1).

7.4.2 CAPACIDAD PARA ELIMINAR EL ANIÓN SUPERÓXIDO (•O₂⁻)

La capacidad de los extractos para capturar radicales superóxido (•O₂⁻) se determinó por un método no enzimático descrito por Nishikimi, et al. (1972), se prepararon 10 ml de extracto a diferentes concentraciones (entre 0.1 y 1.0 mg/ml) a partir de una solución madre de 10 mg/ml en MeOH / agua 1/1. Se mezclaron 1 ml de nitroazul de tetrazolio (NTB) ([100µM] en tampón fosfato salino), 1 ml de

NADH ([465µM] en tampón fosfato salino) y 1 ml de extracto. La reacción se inició con 150 µl de metosulfato de fenazina (PMS) ([60µM] en tampón fosfato salino), y se incubó en baño María durante 15 min. Se midió la absorbancia de las soluciones (A₁) usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de análisis de 560 nm. El porcentaje de inhibición se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = (A_0 - (A_1 - A_2)) / A_0$$

Donde:

A₀: absorbancia testigo, se reemplazó la solución de extracto por 1 ml de disolvente utilizado en la preparación de los extractos.

A₁: absorbancia de las soluciones con extracto.

A₂: corresponde a la absorbancia de una mezcla compuesta de 1 ml de la solución de extracto, a la que se le agregaron 2.1 ml de solución de tampón fosfato salino.

7.4.3 CAPACIDAD PARA ELIMINAR EL RADICAL HIDROXILO (OH•)

La actividad antirradicalaria de los extractos frente al radical hidroxilo (OH•) se determinó por el método descrito por Smirnov & Cumbes (1996). Se prepararon las soluciones de extractos a diferentes concentraciones en el dimetilsulfóxido (DMSO). En tubos de ensayo se agregaron 2 ml de la solución de extractos en varias concentraciones, 600 µl FeSO₄ (8mM), 500 µL de H₂O₂ (20 mM). Se inició la reacción mediante la adición de 2 ml de la solución de ácido salicílico (3 mM), se agitaron cada uno de los tubos y luego se llevaron a baño María durante 30 min, se añadieron 900 µl de agua destilada, se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se midió la absorbancia (A₁) a una longitud de onda de análisis de 510nm utilizando el espectrofotómetro. El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ inhibición} = (A_0 - (A_1 - A_2)) / A_0$$

Donde:

A₀: absorbancia testigo, se reemplaza la solución de extracto con 2 ml de MeOH/agua.

A₁: absorbancia de las soluciones con los extractos.

A₂: corresponde a la absorbancia de una mezcla compuesta de 2 ml de la solución de extracto a la cual se le añaden 4 ml de agua destilada.

7.4.4 CAPACIDAD PARA ELIMINAR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂)

La determinación de la capacidad de los extractos para eliminar el peróxido de hidrógeno se realizó por el método descrito por Ruch, et al. (1989), en donde se

prepararon soluciones de los extractos con concentraciones entre 0.1 y 0.5 µg / ml a partir de una solución madre de 5mg/mL en solución de tampón fosfato salino a 0.01M con pH de 7.4. En tubos de ensaye se agregaron 3.4 mL de la solución de los extractos y 600 µl de solución de H₂O₂ (40mM), se agitaron y al paso de 3 min se analizó la absorbancia de las soluciones a una longitud de onda de 230nm. La fórmula para determinar el porcentaje de inhibición es:

$$\% \text{ inhibición} = (A_0 - (A_1 - A_2)) / A_0.$$

El blanco corresponde a 4mL de la solución de tampón fosfato salino.

Para A₀ (~ 0.39) se reemplaza la solución del extracto por 3.4mL de tampón fosfato salino.

A₁ corresponde a la solución de la reacción.

A₂ corresponde a una mezcla de 3.4mL de la solución del extracto más 600 µl de solución de tampón fosfato salino.

7.4.5 CAPACIDAD PARA ELIMINAR EL ÓXIDO NÍTRICO

Los extractos fueron evaluados por el método descrito por Sreejayan & Rao (1997). Para la comparación de resultados, se realizó también la prueba a un extracto de cúrcuma (*Curcuma longa*). Se prepararon soluciones de los extractos de diferentes concentraciones entre 0.2 y 2.0mg/mL a partir de una solución madre de 10mg/mL en MeOH/agua 1/1. En un tubo de ensayo se agregaron 0.5mL de una solución de nitroprusiato de sodio 10mM en tampón fosfato salino a 0.01M de pH 7.4 más 0.5mL de las soluciones de los extractos. Se mezclaron y se inició la reacción colocándolos en baño María a 37 °C durante 2.5 h. Transcurrido ese tiempo se mantuvieron las muestras 20 min a temperatura ambiente y se agregó 1 mL de reactivo de Griess y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 40 min para medir la absorbancia (A₁) a una longitud de onda de 548 nm. La fórmula para calcular la inhibición del óxido nítrico es:

$$\% \text{ inhibición} = (A_0 - (A_1 - A_2)) / A_0$$

El blanco corresponde a 0.5 ml de MeOH /agua + 0.5 ml de tampón fosfato salino + 1 ml de reactivo de Griess.

Para A₀, hacer lo mismo que con A₁ pero reemplazar la solución del extracto con 0.5 ml de disolvente utilizado en la preparación de los extractos.

A₂ corresponde a una mezcla compuesta de 0.5 ml de la solución de extracto + 0.5 ml de tampón fosfato salino + 1 ml de reactivo de Griess.

7.4.6 CAPACIDAD PARA ELIMINAR EL ÁCIDO HIPOCLOROSO

La capacidad para eliminar el ácido hipocloroso fue evaluado con el método enzimático descrito por Qurora & B (1987). Se preparó una solución de HOCl: NaOCl al 1% (v/v) pH = 11.24 + H₂SO₄ 70%, ajustada a pH 6.2 y una solución de catalasa bovina en tampón fosfato salino (PBS) a 49.8 µM. La concentración de la enzima fue calculada a 235nm ($\epsilon = 100$ debe obtener $A \approx 4,89$), se diluyeron 10 mL de esta solución en 100 mL de PBS, donde a 235 nm con $A \approx 1.43$ corresponde a una concentración de HOCl de 14.3 mM. En tubos de ensayo se colocaron 1 mL de la solución de los extractos a diferentes concentraciones y 1 mL de la solución de HOCl en PBS. Se incubaron en baño María 15 min a 37 °C. Después se adicionó la catalasa [18 µM] y se incubó de nuevo 15 min a 37 °C, después los tubos se centrifugaron a 1200 rpm durante 15 min, la medición en el espectro se realizó en el sobrenadante a 404 nm. La absorbancia de la catalasa menos la absorbancia de la catalasa más HOCl representa la degradación del 100% de catalasa (o 0% de actividad). La capacidad de los extractos para atrapar HOCl se evalúa mediante la comparación de este valor y la diferencia en la absorbancia de la catalasa menos la absorbancia de la catalasa más HOCl en presencia del extracto.

7.5 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO BRUTO MÁS PROMETEDOR, RE-CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ESTUDIO DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En base a los estudios de caracterización química y las pruebas antioxidantes, se eligió el extracto más prometedor para ser purificado con el fin de reducir moléculas indeseadas y tener una mayor concentración de polifenoles. Para ello se siguió el siguiente procedimiento, descrito por García-Pérez, et al., (2012). Se pesaron 6.5 g del extracto bruto purificado y se suspendieron en 250 mL de H₂O destilada, agitando hasta homogenizar. La solución se filtró un con crisol Gooch. El filtrado fue colocado en un embudo de separación y se agregaron 100 mL de hexano. Se agitó vigorosamente y se dejó reposar hasta que se notara la separación de las dos fases de los solventes, insolubles entre ellos. La fracción acuosa se recuperó y la fracción de hexano se desechó. La fracción acuosa fue lavada 4 veces más de la misma manera con hexano, en la quinta lavada, la fracción acuosa fue colectada y vertida de nuevo en el embudo de separación y se agregaron 100 mL de acetato de etilo puro, se agitó vigorosamente y se dejó reposar el embudo hasta notarse la separación de las dos fases. La fracción acuosa se colectó en un matraz Erlenmeyer para volver a lavarla con acetato de etilo por 4 veces más, ya que los compuestos de interés se encuentran disueltos en este solvente. Las fracciones de acetato de etilo se colocaron en el matraz de un rotavapor con sistema de vacío, donde a 55 °C fue destilado el acetato de etilo y se recolectó la fracción de extracto purificado en tubos Falcon para llevarlo al

proceso de liofilizado. Una vez liofilizado el extracto purificado, se realizaron por los métodos espectrofotométricos ya descritos anteriormente para estudios de caracterización química (véase punto 7.3) al igual que las pruebas antioxidantes (véase punto 7.4).

7.6 ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA EN ARTEMIA FRANCISCANA

7.6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Nauplios *Artemia franciscana* de 24, 48 y 72 h de edad fueron obtenidos del laboratorio de Toxicología Ambiental de la Facultad de Químico-Farmacobiología, de la UMSNH, a partir de la hidratación de quistes (Argent Chemical Laboratories, Washington, USA) a 4°C por 12 h y posterior incubación a 28 °C en agua marina (Sera Premium, Germany) a 35g/L⁻¹ de salinidad pH de 8.4±0.2 a 24 h a una intensidad de fotones de 18.5 µmol/m²s.

7.6.2 DETERMINACIÓN DE MORTALIDAD EN ARTEMIA FRANCISCANA

La metodología para la determinación de las Concentraciones Letales 50% (CL₅₀) se basó en la descrita por Persoone et al., 1989 y por Sánchez-Fortún et al., 1995, que consiste en la determinación de la concentración que causa la muerte del 50% de nauplios a corto plazo de *Artemia* sobre placas de cultivo celular de 24 pocillos (Sarstedt Inc., USA®) (Persoone, et al., 1989), (Sánchez-Fortún, et al., 1995). En cada pocillo se incluyeron 10 nauplios de *Artemia franciscana* los cuales fueron expuestos a las distintas concentraciones (10m/L, 100 m/L, 500 m/L, 750 m/L y 1g/L) del extracto purificado de *Q. crassifolia* en un volumen total de 1 ml. Para cada concentración se estableció un control y ocho repeticiones, se incubaron las placas a 28 °C por 24 h en ambiente de oscuridad. Para determinar el número de nauplios muertos en cada pocillo, se realizó la lectura a través de estereoscopio (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany®) a las 24, 48 y 72 h de incubación con el objetivo de evaluar mediante la mortalidad de las artemias, la toxicidad del extracto.

8. RESULTADOS

8.1 COLECTA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LAS CORTEZAS

Las tres cortezas de encino de interés comercial para la industria forestal que fueron utilizadas en la presente investigación fueron recolectadas en Ciudad Hidalgo, Estado de Michoacán, México, se muestran en la Figura 8. Las mismas fueron identificadas por expertos en botánica forestal, el Dr. Pablo Cuevas Reyes y el M.C Javier Madrigal de la Facultad de Biología de la UMSNH.



Quercus crassifolia



Quercus laurina



Quercus scytophylla

Ilustración 8. Cortezas recolectadas en C. Hidalgo, Michoacán, utilizadas en la presente investigación.

En la Tabla 4 se muestran los nombres comunes utilizados en la región y su correspondencia con la identificación botánica realizada por los expertos.

Tabla 4. Nombre común de encinos y especies identificadas.

Nombre Común	Especie
Blanco	<i>Quercus crassifolia</i>
Escobillo	<i>Quercus laurina</i>
Roble	<i>Quercus scytophylla</i>

8.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS BRUTOS

En la Figura 9 se representan los rendimientos de extracción expresados en porcentaje con relación a la corteza seca. Es posible notar que se observa un mayor rendimiento de extracción en el caso de *Q. crassifolia* al agua caliente seguido por el extracto *Q. laurina*, también obtenido por extracción al agua caliente. En general la extracción al agua caliente produjo mayores rendimientos de extracción que la extracción por maceración.

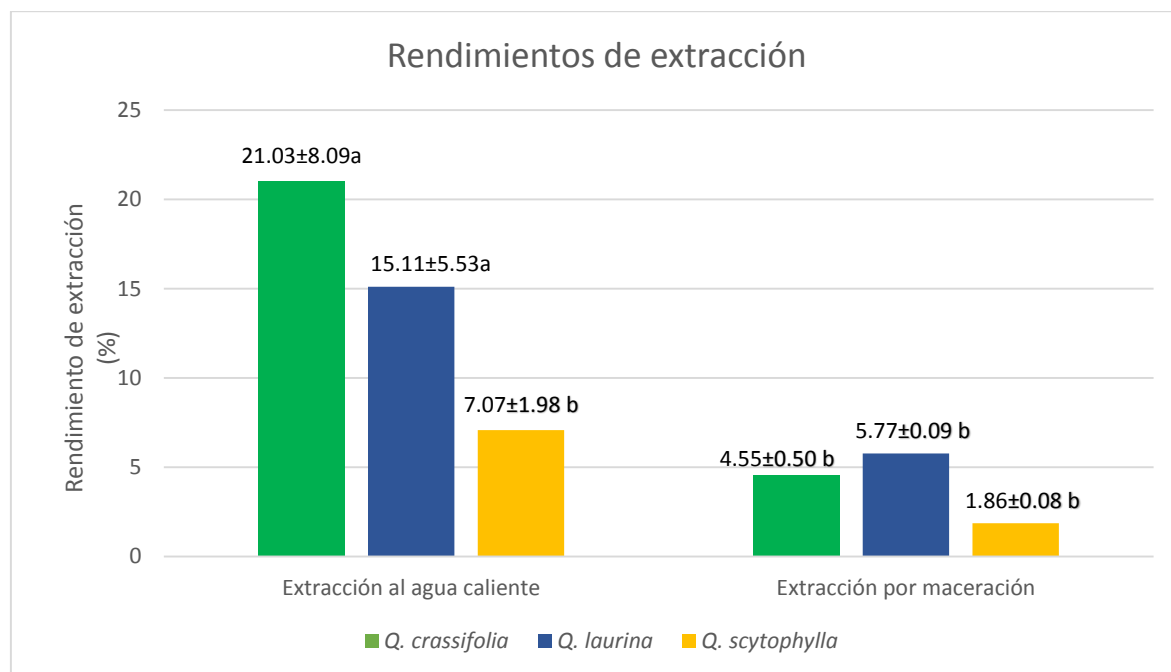


Ilustración 9. Rendimientos de extracción con relación a la masa de cortezas de encinos (*Quercus* sp) por el método de extracción al agua caliente y extracción por maceración (etanol/agua 90/10 V/V).

8.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

La Tabla 5 muestra los resultados de la caracterización química realizada a los extractos de cortezas de encinos obtenidos por los dos métodos de extracción. Puede observarse que los extractos de *Q. crassifolia* obtenidos al agua caliente y maceración, así como el de *Q. laurina* por maceración y el Oligopin® presentaron el mayor contenido en fenoles totales comparativamente al resto de los extractos analizados. En cuanto al contenido de flavonoides, el extracto de *Q. crassifolia* obtenido por extracción al agua caliente presentó los mayores contenidos de flavonoides, incluso en una mayor cantidad que el extracto comercial Oligopin®. Dicho extracto comercial presentó los mayores contenidos en ácidos hidroxicinámicos, seguido del extracto de *Q. crassifolia* al agua caliente. En cuanto

al contenido en proantocianidinas, nuevamente el extracto comercial Oligopin® presentó la mayor cantidad de proantocianidinas, seguido del extracto de *Q. crassifolia*, obtenido por maceración.

Tabla 5. Caracterización química de los extractos de los encinos del género Quercus.

Extracto	Fenoles totales (mg EAG/g)	Flavonoides totales (mg EQ/ g)	Ácidos hidroxicinámicos totales (mg EACI/g)	Contenido de proantocianidinas (mg ECIC/g)
<i>Quercus crassifolia</i> Agua caliente	<u>746.54±41.09^c</u>	<u>25.42±0.64^f</u>	<u>234.67±1.53^d</u>	25.74±1.25 ^b
<i>Quercus crassifolia</i> Maceración	<u>694.88±61.88^c</u>	14.01±0.31 ^c	<u>268.67±36.90^d</u>	<u>53.50±0.96^d</u>
<i>Quercus laurina</i> Agua caliente	474.04±43.92 ^b	24.08±1.12 ^e	132.67±4.04 ^b	14.19±0.38 ^a
<i>Quercus laurina</i> Maceración	<u>756.13±16.82^c</u>	15.73±0.21 ^d	145.33±17.01 ^{b,c}	24.28±1.84 ^b
<i>Quercus scytophylla</i> Agua caliente	329.46±37.51 ^a	24.08±0.47 ^e	113.00±3.46 ^a	12.55±2.32 ^a
<i>Quercus scytophylla</i> Maceración	521.13±40.06 ^b	12.89±0.33 ^b	172.67±12.90 ^c	48.41±3.82 ^c
Oligopin ®	735.71±19.94 ^c	6.44±0.24 ^a	336.67±27.96 ^e	69.22±0.82 ^e

Las letras diferentes en la misma columna, significa que hay diferencias significativas a $p < 0.05$. ANOVA, prueba de Duncan.

8.4 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

La Tabla 6 muestra la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos y del Oligopin®. Para el análisis de estos resultados se consideró la determinación de la EC₅₀. Tal y como se observa en la tabla, el extracto de *Q. crassifolia* al agua presentó la mejor capacidad de captar al radical hidroxilo, siendo esta capacidad incluso superior a la del extracto comercial. El extracto de *Q. crassifolia* por maceración, el extracto de *Q. crassifolia* al agua y el Oligopin® presentaron las mejores capacidades para captar al anión superóxido. En cuanto a la capacidad para captar al radical peroxilo, *Q. scytophylla* al agua presentó la mejor capacidad antioxidante, mientras que el extracto comercial Oligopin® captó más eficientemente al peróxido de hidrógeno que los extractos de las tres especies mexicanas. La capacidad para captar al óxido nítrico fue mayor en el caso del

extracto de *Q. laurina* por maceración, quien mostró también una alta capacidad para captar al ácido hipocloroso.

Tabla 6. Capacidad antioxidante de los extractos del género *Quercus*.

Extracto	Capacidad de captar el radical hidroxilo EC ₅₀ (µg/ml)	Capacidad de captar el radical anión superóxido EC ₅₀ (µg/ml)	Capacidad de captar el radical peroxilo EC ₅₀ (µg/ml)	Capacidad de captar peróxido de hidrógeno EC ₅₀ (µg/ml)	Capacidad de captar el óxido nítrico EC ₅₀ (µg/ml)	Capacidad de captar el ácido hipocloroso EC ₅₀ (µg/ml)
<i>Q. crassifolia</i> Agua	<u>918.19±9.17^a</u>	<u>80.45±0.71^a</u>	577.01±40.30 ^{b,c}	596.92±162.49 ^b	*Sin actividad	740.37±53.93 ^b
<i>Q. crassifolia</i> Maceración	2023.55±197.65 ^c	<u>40.89±16.40^a</u>	1747.26±86.70 ^e	652.61±122.26 ^b	873.39±48.96 ^c	1275.68±39.81 ^c
<i>Q. laurina</i> Agua	1257.04±75.15 ^b	628.81±8.87 ^b	582.14±15.11 ^b	727.34±56.85 ^b	*Sin actividad	774.47±191.61 ^b
<i>Q. laurina</i> Maceración	*Sin actividad	3212.76±917.34 ^c	621.67± 47.92 ^c	519.11±116.46 ^b	<u>149.47±17.19^b</u>	<u>386.94±85.93^a</u>
<i>Q. scytophylla</i> Agua	1864.55±396.37 ^c	*Sin actividad	<u>390.47±160.29^a</u>	1101.64±48.80 ^c	*Sin actividad	866.29±183.33 ^b
<i>Q. scytophylla</i> Maceración	*Sin actividad	406.20±134.67 ^b	856.38±23.60 ^d	1049.76±165.80 ^c	661.03±177.39 ^c	952.66±211.64 ^b
Oligopin®	1270.92±72.05 ^b	<u>104.44±8.00^a</u>	<u>563.49±32.85^{b,c}</u>	<u>174.43±9.54^a</u>	*Sin actividad	1310.42±114.41 ^c
Cúrcuma					<u>53.84±39.04^a</u>	

Las letras diferentes en la misma columna, significa que hay diferencias significativas a $p < 0.05$. ANOVA, prueba de Duncan. EC₅₀>4000 µg/m=sin actividad.

La realización de una comparación, sustentada en un análisis estadístico, se muestra en la Tabla 7. Dicho análisis permitió seleccionar el extracto de *Q. crassifolia* por extracción al agua caliente como el que presento la mejor capacidad antioxidante en base a sus excelentes propiedades antioxidantes y su elevado rendimiento de extracción.

Tabla 7. Capacidad antioxidante comparativa de los extractos polifenólicos obtenidos a partir de especies mexicanas pertenecientes al género *Quercus*.

Especie reactiva	Capacidad antioxidante de los extractos de especies mexicanas
Hidroxilo	QCA>QLA>QSA= QCM>QLM=QSM
Superóxido	QCA=QCM>QLA=QSM>QLM>QSA
Peroxilo	QSA>QCA=QLA >QLM>QSM>QCM
Peróxido de hidrógeno	QCA=QLM=QCM=QLA>QSA=QSM
Óxido nítrico	QLM> QSM=QCM >QCA=QLA= QSA
Ácido hipocloroso	QLM> QCA= QLA= QSA = QSM > QCM

QCA=*Q. crassifolia* agua; QCM= *Q. crassifolia* maceración; QLA= *Q. laurina* agua; QLM= *Q. laurina* maceración; QSA= *Q. scytophylla* agua; QSM= *Q. scytophylla* maceración.

8.5 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO BRUTO MÁS PROMETEDOR, RE-CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ESTUDIO DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

La Tabla 7 muestra el rendimiento de extracción del extracto purificado con relación al extracto bruto. Se observa que el extracto purificado posee un rendimiento de extracción significativamente menor que el extracto bruto.

Tabla 8. Rendimiento de extracción del extracto purificado de *Q. crassifolia*.

EXTRACTO	RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN (%)
<i>Q. crassifolia</i> agua crudo	20.04±7.71*
<i>Q. crassifolia</i> agua purificado	2.70 ± 0.33

Medias con *en la misma columna son significativamente diferentes estadísticamente. Prueba t (p < 0.05).

En la Tabla 9 se presenta el contenido de fenoles totales, ácidos hidroxycinámicos, proantocianidinas y flavonoides totales en el extracto bruto obtenido por el método de extracción al agua caliente y el extracto purificado, considerado una fracción enriquecida en compuestos fenólicos. Un análisis de la tabla permite constatar que

efectivamente el extracto purificado presenta un mayor contenido en fenoles totales, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos que el extracto bruto de partida.

Tabla 9. Contenido de fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas del extracto de Q. crassifolia purificado y bruto.

EXTRACTO	FENOLES TOTALES (mg EAG/g)	FLAVONOIDES TOTALES (mg EQ/g)	ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS (mg EACI/g)	PROANTOCIANIDINAS (mg ECIC/g)
<i>Q. crassifolia</i> agua crudo	746.54±41.09b	25.42±0.64b	234.67±1.15b	25.74±1.25a
<i>Q. crassifolia</i> agua purificado	2391.04±185.01a	43.59±0.31a	362.37±13.47a	9.35±0.32b

Medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes estadísticamente con una significancia de $p < 0.05$. (Prueba t). Dónde: EAG: equivalentes de ácido gálico; EQ, equivalentes de quercetina; EACI: equivalentes de ácido clorogénico y ECIC: equivalentes de cloruro de cianidina.

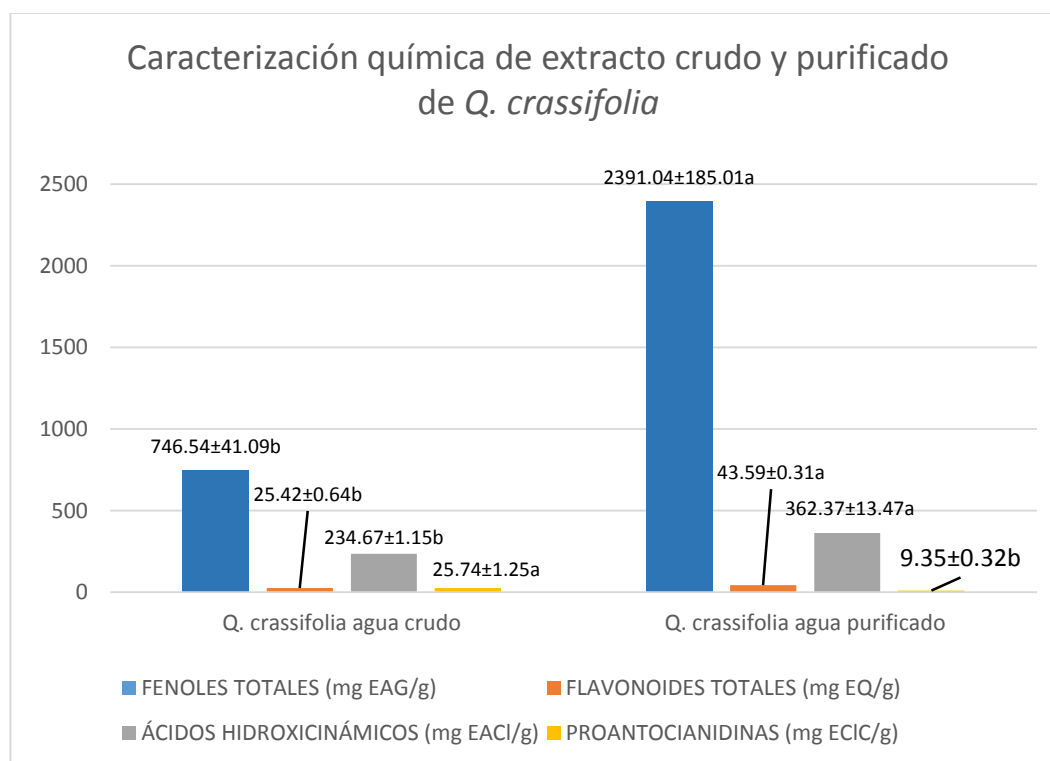


Ilustración 10. Gráfica del contenido de fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas de los extractos de Q. crassifolia crudo y purificado.

La Tabla 10 muestra los valores de capacidad antioxidante del extracto crudo de *Q. crassifolia* al agua caliente y del extracto de *Q. crassifolia* purificado, considerando su capacidad para captar especies reactivas como el ion superóxido, radical hidroxilo, radical peroxilo, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso. Es posible observar que el extracto purificado presentó una mayor capacidad para captar al anión hidroxilo, radical superóxido, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso que su equivalente bruto de partida. Sin embargo, la capacidad antioxidante para captar al óxido nítrico fue comparable en ambos extractos. La capacidad para captar al radical peroxilo disminuyó con el proceso de purificación.

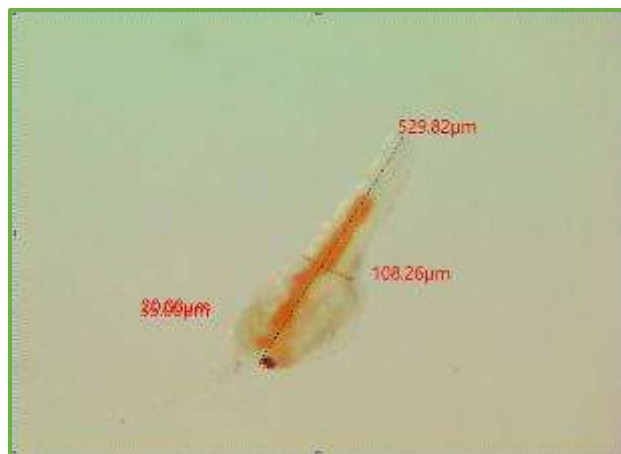
Tabla 10. Actividad antioxidante del extracto purificado de *Q. crassifolia*.

EXTRACTO	OH• EC ₅₀ (µg/ml)	O ₂ •- EC ₅₀ (µg/ml)	ROO• EC ₅₀ (µg/ml)	H ₂ O ₂ EC ₅₀ (µg/ml)	NO• EC ₅₀ (µg/ml)	HClO EC ₅₀ (µg/ml)
<i>Q. crassifolia</i> agua crudo	918.19±9.17a	80.45±0.71a	577.01±40.30b	596.92±162.49a	>4000a	740.37±53.93a
<i>Q. crassifolia</i> agua purificado	467.05±50.00b	58.07±1.61b	716.62±9.18a	21.97±1.82b	>4000a	107.97±24.70b

Medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes estadísticamente con una significancia de $p < 0.05$. (Prueba t). OH•: radical hidroxilo; O₂•-: anión superóxido; ROO•: radical peroxilo; H₂O₂: peróxido de hidrógeno; NO•: radical óxido nítrico; HClO: ácido hipocloroso.

8.6 ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA EN ARTEMIA FRANCISCANA

El estudio de toxicidad aguda aplicado a nauplios de diferentes horas de eclosión de *Artemia franciscana* no se evidenció toxicidad, es decir, que a pesar de la alta concentración de extracto [1g/L] y el tiempo de exposición (hasta 72 h), los nauplios seguían con vitalidad, sin impacto aparente en su morfología (área y perímetro del ojo naupliar, longitud total del nauplio y ancho del estado naupliar) (Figura 11). Sin embargo, el nado de los organismos expuestos al extracto fue más lento en comparación a los nauplios control.



Control



Extracto purificado 24h



Extracto purificado 48h



Extracto purificado 72h

Ilustración 11. Morfología de los nauplios de *Artemia franciscana*, luego de la exposición a 24, 48 y 72 h con el extracto purificado de *Quercus crassifolia*.

9. DISCUSIÓN

En la investigación que se describe en este trabajo se pretende el uso de tres especies mexicanas del género *Quercus* para la obtención de un extracto con alto contenido de polifenoles. Lo anterior con el objetivo de aprovechar su capacidad antioxidante y enfocarlo como tratamiento terapéutico para patologías donde se acentúa el estrés oxidativo, como la psoriasis. Se lograron identificar tres especies de encinos provenientes de Ciudad Hidalgo, Michoacán clasificados por sus características morfológicas macroscópicas, las que fueron nombradas como *Quercus crassifolia*, *Quercus scytophylla* y *Quercus laurina*.

Los resultados de los rendimientos de extracción evidencian que se observa un mayor rendimiento de extracción con agua caliente con recirculación para las especies de *Q. crassifolia* y *Q. laurina*, mientras que para *Q. scytophylla*, no hubo diferencia significativa entre los métodos de extracción utilizados. Si se realiza un análisis global de estos resultados puede decirse que estos concuerdan con los de García-Pérez et al., quienes en 2010 obtuvieron los mayores rendimientos de extracción con agua caliente en recirculación utilizando cortezas de especies canadienses como *Betula alleganiensis*, *Picea mariana*, *Abies balsamea* y *Pinus banksiana*. Las diferencias obtenidas podrían atribuirse a diferencias en cuanto a la solubilidad de varios compuestos presentes en la corteza y a una mayor transferencia de masa a la temperatura más elevada que se usa durante la extracción con agua caliente (García-Pérez, et al., 2010). También es posible observar que *Q. crassifolia* y *Q. laurina* presentaron mayores rendimientos de extracción comparativamente a *Q. scytophylla* por extracción al agua caliente. Aunque no fue posible encontrar estudios exhaustivos en la literatura científica sobre la composición química de extractos polares de estas especies, una posible explicación a este resultado podría deberse a la presencia en su corteza de un mayor número de compuestos polares como glicósidos, azúcares y proantocianidinas poliméricas, lo que justificaría los mayores rendimientos de extracción obtenidos.

La caracterización química realizada por métodos espectrofotométricos demuestra que para el caso de los fenoles totales, *Q. crassifolia* presentó el mismo contenido sin importar el método de extracción utilizado mientras para *Q. laurina* y *Q. scytophylla* la mayor concentración de fenoles se obtuvo por el método de maceración. En cuanto al contenido de flavonoides totales se observan mejores resultados en los extractos al agua caliente en las tres especies. Esto puede explicarse por el hecho de que muchos flavonoides se encuentran unidos a azúcares, lo que los hace muy accesibles por este método de extracción. Concerniente al contenido de ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas la concentración obtenida resultó mayor con el método de extracción por maceración. Lo anterior concuerda con García-Pérez, et al., 2010 que en la investigación con extractos de cortezas de especies de árboles canadienses

obtuvieron mayor concentración de fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxycinámicos y proantocianidinas durante la extracción con maceración.

Algunas especies de *Quercus*, fundamentalmente asiáticas y europeas, han sido analizadas en cuanto a la concentración de fenoles totales. Ejemplo de ello es el extracto acuoso de la madera de *Quercus robur* que comparado con otros extractos acuosos de interés industrial, como el de *Pinus maritima* y el de canela *Cinnamomum zeylanicum* presentó un alto contenido de este tipo de compuestos (Dudonné, et al., 2009). El extracto acuoso de madera de *Q. robur* reporta una concentración de fenoles totales de 397.03 ± 0.005 mg GAE/g, mucho más baja que el de *Q. crassifolia* (746.54 ± 41.09 mg GAE/g) de esta investigación, lo que permite constatar la riqueza en este tipo de moléculas en esta especie michoacana.

En cuanto la capacidad antioxidante de los extractos de especies mexicanas, esta fue comparada con la del extracto Oligopin®, considerado como uno de los extractos comerciales más potentes en cuanto a sus propiedades antioxidantes. Entre las pruebas realizadas se encuentra la capacidad de captar el anión superóxido, este carácter antioxidante está relacionado con la concentración de fenoles totales y de ácidos hidroxycinámicos del extracto (Medinia, et al., 2015). En los resultados obtenidos se muestra que el extracto de *Q. crassifolia* obtuvo la mayor concentración de fenoles totales y ácidos hidroxycinámicos sin diferencia significativa para los métodos de extracción. Del mismo modo, obtuvo la EC₅₀ más baja en comparación a las otras especies. La investigación realizada por Dudonné, et al., 2009 donde se muestra que existe un mayor porcentaje de inhibición en relación con una mayor concentración de fenoles totales así como la investigación de Medina, et al., 2015 donde se encontró que la capacidad de captar al anión superóxido está en correlación con el contenido de ácidos hidroxycinámicos, podría explicar la importante capacidad antioxidante del extracto de *Q. crassifolia*.

Si se analiza la capacidad antioxidante global de los extractos del género *Quercus*, es posible constatar que el extracto de *Q. crassifolia* al agua caliente se encuentra posicionado como el extracto con la mejor capacidad antioxidante. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó a dicho extracto como el más prometedor, por la alta cantidad de polifenoles y su destacada capacidad antioxidante.

También puede observarse que el porcentaje de extracción del extracto purificado se redujo considerablemente. La caracterización química del extracto bruto y purificado, demuestra que el extracto purificado presenta un mayor contenido de fenoles totales, ácidos hidroxycinámicos y flavonoides totales que el bruto de partida, por lo que puede decirse que este último extracto es una fracción enriquecida en compuestos fenólicos. Una mayor concentración de fenoles totales en el extracto purificado comparado con el extracto bruto al agua caliente concuerda con los resultados de Brighete, et al., 2007 donde se ve favorecida la concentración de fenoles totales en la fracción de acetato de etilo ante el extracto acuoso. Los flavonoides totales así como la cantidad de ácidos hidroxycinámicos

también mostraron una mayor concentración en el extracto purificado. Sin embargo, la concentración de proantocianidinas disminuyó, de 25.74 a 9.95 equivalentes de cloruro de cianidina, lo cual concuerda con el estudio efectuado por Diouf, et al., 2009, trabajo en el cual se determinó el contenido de fenoles totales y proantocianidinas de un extracto acuoso de corteza de *Picea mariana*, tanto del extracto crudo, como de la fracción de acetato de etilo. Estos autores obtuvieron como resultado un aumento en la cantidad de fenoles totales para la fracción acetato de etilo, en comparación con el extracto crudo, mientras que la concentración de proantocianidinas, disminuyó en la fracción de acetato de etilo. Este resultado puede explicarse si se considera que la fracción acuosa, que se desecha como resultado de la purificación, contiene principalmente proantocianidinas poliméricas, mientras que la fracción de acetato de etilo está compuesta principalmente por proantocianidinas oligoméricas. Esto supondría que una parte de las proantocianidinas de elevado peso molecular se perdería como resultado del proceso de purificación en consecuencia disminuyendo la concentración de proantocianidinas totales en la fracción acetato de etilo. Cabe destacar que se ha demostrado que las proantocianidinas oligoméricas, debido a su menor peso molecular, poseen mayor actividad biológica que las poliméricas. De hecho, estas últimas, dado su gran tamaño, son incapaces de atravesar las membranas biológicas y consecuentemente no pueden interferir en las vías de señalización relacionadas con la patogénesis de enfermedades (Diouf, et al., 2009).

Los valores de capacidad antioxidante del extracto crudo de *Q. crassifolia* al agua caliente y del extracto purificado muestran que este último mejoró la capacidad de captar estas especies reactivas, es decir, se requiere una menor concentración del extracto de encino purificado para poder captar al 50% de las especies reactivas que se mencionaron. De igual forma, en el trabajo de Diouf, et al., 2009, se pudo observar, que la fracción de acetato de etilo del extracto de corteza de *Picea mariana*, tuvo, en general, una mayor capacidad antioxidante que el extracto crudo. Mientras que para el radical peroxilo, aunque hubo diferencias estadísticamente significativas, el extracto purificado, aumentó la EC₅₀ en comparación al extracto crudo. Lo anterior podría explicarse debido a la pérdida en la fracción acuosa de compuestos que pudieran estar relacionados con la capacidad de captar radicales peroxilo, tales como proantocianidinas poliméricas, taninos hidrolizables, lignanos, estilbenos, moléculas que, hasta el momento, no han sido determinados de manera específica. En lo que respecta al radical óxido nítrico, tanto el extracto crudo como el extracto purificado, a concentraciones menores a 4000 µg/ml, no tuvieron capacidad de captar a la especie reactiva de nitrógeno.

El estudio de toxicidad agudo realizado en *Artemia franciscana* no reportó toxicidad a la concentración de 1000 mg/L del extracto purificado, lo que demuestra una toxicidad muy baja en este modelo. Según los datos de la NMX-R-

019-SCFI-2011 (Secretaría de Economía., 2011) para toxicidad aguda en el ambiente, la concentración a la que fue analizado el extracto purificado de *Q. crassifolia* y los resultados obtenidos, el extracto no clasifica en ninguna de las categorías que se consideran tóxicas para el ambiente.

10. CONCLUSIÓN

En conclusión, los resultados de esta investigación permitieron realizar la colecta e identificación botánica de cortezas de tres especies mexicanas pertenecientes al género *Quercus* de importancia para la industria forestal del estado de Michoacán. Lo anterior permitió obtener 6 extractos brutos liofilizados utilizando dos protocolos de extracción: la extracción al agua caliente y la maceración con una mezcla de etanol/agua (90%). La composición química de los extractos obtenidos en términos de su contenido en fenoles totales, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas demostró que el extracto de *Quercus crassifolia* al agua caliente era el que presentaba un mayor contenido en compuestos fenólicos. Dicho extracto también mostró las mayores propiedades antioxidantes, por lo que fue considerado el extracto más prometedor obtenido a partir de cortezas de encinos mexicanos. La purificación del mismo permitió obtener una fracción enriquecida en compuestos polifenólicos con mayor capacidad antioxidante que el extracto crudo de partida. El estudio toxicológico realizado puso en evidencia que el extracto purificado de *Quercus crassifolia* no clasificaba en ninguna de las categorías tóxicas para el medio ambiente. Sin embargo, otros estudios toxicológicos en especies roedoras son necesarios para determinar la inocuidad de este extracto y su potencial para el desarrollo de un nuevo producto farmacéutico orientado al tratamiento de la psoriasis.

11. RECOMENDACIONES

Aunque este trabajo permite la pre-caracterización química de extractos polifenólicos a partir de cortezas de especies mexicanas de encino poco estudiadas, así como su evaluación toxicológica y antioxidante muchos otros aspectos pueden analizarse en trabajos futuros, notablemente:

- a) La obtención de extractos polifenólicos utilizando diferentes pH, con el objetivo de obtener extractos enriquecidos en subgrupos particulares de fenoles, por ejemplo, ácidos fenólicos, catequinas y dihidrochalconas.
- b) La determinación de otros tipos de taninos, como los hidrolizables, en las cortezas estudiadas, los que han sido reportados en especies de *Quercus* europeas como *Q. rubra*, *Q. petraea* y *Q. alba* (Scalbert, et al., 1989), (Bianco, et al., 1998), (Stevanovic, et al., 2009) y analizar su impacto en las propiedades antioxidantes.
- c) La evaluación de la capacidad antioxidante utilizando otros métodos como ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno), CUPRAC (Capacidad antioxidante para reducir el ión cobre) y DPPH (captación del radical 2,2- Difenil-1-Picril hidrazilo) con el objetivo de determinar la capacidad antioxidante total de los extractos.

BIBLIOGRAFÍA

Albuquerque-Sarmiento, P. d. y otros, 2014. Evaluación del extracto de la *Zeyheria tuberculosa* en la perspectiva de un producto para la cicatrización de heridas.. *Rev. Latino Am. Enfermagem*, 22(1), pp. 165-172.

Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K. & Ryan, D., 2000. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *The Analyst Critical Review*, 125(1), pp. 989-1009.

Arizaga, S., Martínez-Cruz, J., Salcedo-Cabrales, M. & Bello-González, M. Á., 2009. Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos.

Aruoma, O. & B., H., 1987. Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase.. *Biochem J.*, 248(3), pp. 973-6.

Asociación Mexicana contra la Psoriasis, 2014. *Asociación Mexicana contra la Psoriasis*. [En línea]
Available at: <http://asociacionpsoriasis.mx/que-es-la-psoriasis>
[Último acceso: 17 Junio 2016].

Athar, M., 2002. Oxidative stress and experimental carcinogenesis.. *Indian J Exp Biol*, 40(1), pp. 656-671.

Avello, M. & Suwalsky, M., 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección.. *Atenea (Concepción)*, Issue 494, pp. 161-172.

Azuola, R. & Vargas-Aguilar, P., 2007. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EAU). *Tecnología en Marcha*, 20(4), pp. 30-40.

Baz, K. y otros, 2003. Oxidant/antioxydant status in patients with psoriasis.. *Yonsei Medical Journal*, 44(6), pp. 987-990.

Berger, M., 2006. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances.. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20(1), pp. 48-53.

Bianco, M., A., H. & Savolainen, H., 1998. Quantitative analysis of ellagic acid in hardwood samples.. *Science of the Total Environment*, 222(1), pp. 1223-126.

Blondet, L. V. -, 2008. Patogenia de la psoriasis. *Dermatología Peruana*, 18(4), pp. 340-345.

Bocco, A., Cuvelier, M. E., Richard, H. & Berset, C., 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts.. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(66), pp. 2123-2129.

Brighentea, I., Diasa, M., Verdia, L. & Pizzolattia, M., 2007. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. *Pharmaceutical Biology*, 45(2), pp. 156-161.

Brighente, I., Dias, M., Verdi, L. & Pizzolatti, M. G., 2007. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology*, 45(2), p. 156–161.

Butler, M., 2008. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials.. *Nat.Prod.Rep*, 25(1), pp. 475-516.

Canadian Dermatology Association, 2009. *Canadian guidelines for the management of plaque psoriasis*. Primera ed. Toronto, Ontario.: Community ReVieweRs.

Chaarani J, Lebwohl M., 2010. Alefacept: where it stands today.. *Expert opinion on drug Metabolism & Toxicology*, 6(3), pp. 355-361.

Chaarani, J. & Lebwohl, M., 2010. Alefacept: where it stands today. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 6(3), pp. 355-361.

Chatonnet, p. & Dubourdieu, D., 1998. Comparative Study of the Characteristics of American White Oak (*Quercus alba*) and European Oak (*Quercus petraea* and *Q. robur*) for Production of Barrels Used in Barrel Aging of Wines. *American Journal of Enology and Viticulture January*, 49(1), pp. 79-85.

Ching-Hsein, C. y otros, 2007. The efficacy of protective effects of tannic acid, gallic acid, ellagic acid, and propyl gallate against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damages in IMR-90 cells. *Molecular Nutrition*, 51(8), p. 962–968.

Díaz-Murillo, V. y otros, 2016. *Natural Health Products for Psoriasis Management. In Psoriasis: Epidemiology, Diagnosis and Management Strategies*.. Primera ed. s.l.:Nova Sciences Publishers..

Diouf, P. N., Stevanovic, T. & Cloutier, A., 2009. Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions.. *Food Chemistry*, 11(4), pp. 897-902.

Dudonné, S. y otros, 2009. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 57(1), pp. 1768-1774.

Duvic, M., Nagpal, S., Asano, A. & Chandraratna, R., 1997. Molecular mechanisms of tazarotene action in psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 37(1), pp. 18-24.

Erkin G, Ugur Y, Gurer CK, Asan E, Korkusuz P, Sahin S, Kolemen F., 2007. Effect of PUVA, narrow-band UVB and cyclosporin on inflammatory cells of the psoriatic plaque.. *Journal of Cutaneous Pathology*, 34(3), pp. 213-219.

Erkin, G. y otros, 2007. Effect of PUVA, narrow-band UVB and cyclosporin on inflammatory cells of the psoriatic plaque.. *Journal of cutaneous pathology*, 34(3), pp. 213-219.

Escribano-Bailón, C. & Santos-Buelga, M. T., 2003. *Polyphénols extraction from foods. Methods in polyphenol analysis*. Cambridge: In T. G. House.

Fairbanks, y otros, 1999. Methotrexate inhibits the first committed step of purine biosynthesis in mitogen-stimulated human T-lymphocytes: a a metabolic basis for efficacy in rheumatoid arthritis. *The Biochemical Journal*, 342(1), pp. 143-152.

Fernández-Calienes, A. y otros, 2009. Evaluación de la toxicidad de extractos de planas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de Artemia salina L.. *Rev Cubana Med*, 61(3).

Fernandez-De-Simon, B., Cadahia, E. & Jalocha, J., 2003. Volatile Compounds in a Spanish Red Wine Aged in Barrels Made of Spanish, French, and American Oak Wood.. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51(26), pp. 7671-7678.

Finkel, T., 2000. Redox-dependent signal transduction.. *FEBS Lett.*, 476(1), pp. 52-4.

Finlay, A. Y., 2005. Current severe psoriasis and the rule of tens. *British journal of dermatology*, 152(5), pp. 861-867.

Folium, F., 2002. *European Pharmacopoeia*. Cuarta ed. Strasbourg.: DEQS.

Fredalina-Basri, D., Si-Tan, L., Shafiei, Z. & Mohamad-Zin, N., 2012. *In Vitro Antibacterial Activity of Galls of Quercus infectoria Olivier against Oral Pathogens*. [En línea]
Available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/632796>
[Último acceso: 08 Junio 2016].

Fridrich, D., Glabasnia, A. & Fritz, J., 2008. Oak ellagitannins suppress the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in human colon carcinonma cells.. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.*, 56(1), p. 3010.

Fridrich, D., Glabasnia, A. & Fritz, J., 2008. Oak ellagitannins suppress the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in human colon carcinonma cells.. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56(1), pp. 3010-5.

Fundación carlos Slim, 2014. *Academia. Comunidad digital del conocimiento.* [En línea]
Available at: <http://repositoriodigital.academica.mx/jspui/handle/987654321/182165>
[Último acceso: 10 Junio 2016].

Fundación para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica., 2012. *Guía de desarrollos preclínicos.* s.l.:s.n.

Gámez, R., 2007. Aspectos generales de los estudios toxicológicos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 38(3).

García Muñoz, S., 2006. *Síntesis de Neolignanos Dihidrobenczo [b] furánicos.* s.l.:Universidad Almería.

García-Pérez, M., 2012. *Tesis de Doctorado. Facultad de Farmacia. Universidad Laval.* s.l.:s.n.

García-Perez, M.-E., 2015. Los productos naturales y el descubrimiento de nuevos medicamentos en la actualidad-. *Lectura Científica Nivel Medio Superior*, pp. 55-62.

García-Pérez, M.-E.y otros, 2014. Picea mariana polyphenolic extract inhibits plogogenic mediators produced by TNF- α -activated psoriatic keratinocytes: Impact on NF- κ B pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), pp. 265-278.

García-Pérez, M., Jean, J. & Pouliot, R., 2012. Antipsoriatic drug development: challenges and new emerging therapies.. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.*, 6(1), pp. 3-21.

García-Pérez, M.-E.y otros, 2012. Picea mariana bark: A new source of trans-resveratrol and other bioactive polyphenols. *Food Chemistry*, 135(3), p. 1173–1182.

García-Pérez, M.-E.y otros, 2010. Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes.. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), pp. 251-258.

García-Sánchez, A., Ramos-Martos, M. & Ballesteros, E., 2005. Estudio comparativo de distintas técnicas analíticas (espectroscopía de NIR y RMN y extracción mediante Soxhlet) para la determinación del contenido graso y de humedad en aceitunas y orujo de Jaén. *Departamento de Química Física y Analítica. Escuela Politécnica Superior de Linares*, 57(3), pp. 220-227.

Gerritsen, M. y otros, 1993. Topical treatment of psoriatic plaques with 1,25-dihydroxyvitamin D3: a cell biological study.. *The British journal of dermatology*, 128(6), pp. 666-673.

Ghoreschi K, Mrowietz U, Rocken M., 2003. A molecule solves psoriasis? Systemic therapies for psoriasis inducing interleukin 4 and Th2 responses.. *Journal of Molecular Medicine*, 81(8), pp. 471-480..

Ghoreschi, K., Mrowietz, U. & Rocken, M., 2003. A molecule solves psoriasis? Systemic therapies for psoriasis inducing interleukin 4 and Th2 responses. *Journal of molecular medicine*, 81(8), pp. 471-480.

Gilbert M. Rishton, P., 2008. Natural products as a robust source of new drugs and drug. *The American Journal of Cardology*, 101(10), pp. S43-S49.

Gommans, J. y otros, 1979. Studies on the plasme membrane of normal and psoriatic keratinocytes.. *British Journal of Dermatology.*, Volumen 101, pp. 407-409.

Gonzalez, S., Queiro, R. & Ballina, J., 2012. Actualización en la patogenia de la artritis psoriática.. *Reumatología Clínica.*, 8(1), pp. S1-S6.

Gottlieb, A. B. y otros, 2005. TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques.. *J Immunol.*, 175(4), pp. 2721-2729.

Griffiths CE, Christophers E, Barker JN, Chalmers RJ, Chimenti S, Krueger GG, Leonardi C, Menter A. Ortonne, J. P., and Fry, L., 2007. A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype.. *The British Journal of Dermatology.*, 156(2), pp. 258-262.

Griffiths, C. E. & Barker, J. N., 2007. Pathogenesis and clinical features of psoriasis.. *Lancet*, 370(9583), pp. 263-271.

Griffiths, C. E. y otros, 2007. A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype.. *The British journal of dermatology*, 156(2), pp. 258-262.

Güllüce, M. A. A. y otros, 2004. Antimicrobial effects of Quercus ilex L. extract. *Phytotherapy Research*, 18(1), pp. 208-211.

Hadi, M., 2004. *La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques.*.. Strasbourg.: S.n.

Haley, S. L. y otros, 2007. Xenobiotic metabolism of plant secondary compounds in oak (Quercus agrifolia) by specialist and generalist woodrat herbivores, Genus neotoma. *Journal of Chemical Ecology*, Volumen 33, pp. 2111-2122.

Haraguchi, H., Harumi, I., Noritoshi, S. & Ayumi, F., 1997. Antiperoxidative activity of neolignans from Magnolia obovata. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49(2), p. 209–212.

Hemwimon, S., Pavasant, P. & Shotipruk, A., 2007. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of Morinda citrifolia.. *Separation and Purification Technology.*, 54(1), pp. 44-50.

Hsu, S. y otros, 2007. Green tea polyphenol induces caspase 14 in the epidermal keratinocytes vía MAPK pathways and reduces psoriasiform lesions in the flaky skin mouse model. *Experimental Dermatology*, 16(8), pp. 678-684.

Ignat, I., Volf, I. & Popa, V. I., 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables.. *Food Chemistry*, 126(4), pp. 1821-1835.

Izquierdo, S. y otros, 2013. Extracción asistida por microondas de lípidos de semillas de Curcubita pepo L. (calabaza). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1).

Janssen-Cilag S.A., 2015. *Psoriasis 360*. [En línea] Available at: <http://www.psoriasis360.es/> [Último acceso: 16 Junio 2016].

Jean, J., Garcia-Perez, M., Guérard, S. & Pouliot, R., 2011. Current knowledge in psoriasis: an overview of the skin disease. En: *In: Psoriasis, causes, diagnosis and treatment*. s.l.:Carrasco JA., pp. 63-104.

Khenouf, S., Amira, S., Arrar, L. & Baghiani, A., 2010. Effect of Some Phenolic Compounds and Quercus Tannins on Lipid Peroxidation. *World Applied Sciences Journal*, 8(9), pp. 1144-1149.

Kima, J.-E. y otros, 2010. Cocoa polyphenols suppress TNF- α -induced vascular endothelial growth factor expression by inhibiting phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase kinase-1 (MEK1) activities in mouse epidermal cells. *British Journal of Nutrition*, 104(07), pp. 957-964.

Kizaki, H., Matsuo, I. & Sakurada, T., 1977. Xanthine oxidase and guanase activities in normal and psoriatic epidermis.. *Clinica chimica acta.*, 75(1), pp. 1-4.

Kostyuk, V., Potapovich, A. & De Luca, C., 2010. The promise of plant polyphenols as the golden standard skin anti-inflammatory agents. *Current Drug Metabolism.*, 11(5), pp. 415-424.

Krueger, G. y otros, 2001. The impact of psoriasis on quality of life: results of a 1998 National Psoriasis Foundation patient-membership survey.. *Archives of dermatology*, 137(3), pp. 280-284.

Kumar, B., Saraswat, A. & Kaur, I., 2002. Palmoplantar lesions in psoriasis: a study of 3065 patients. *Acta dermato-venereologica.*, 82(3), pp. 192-195.

Langley, R. G. B., Krueger, G. G. & Griffiths, C. E. M., 2005. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis*, 64(1), pp. 18-23.

Laza-Loaces, D., Rodriguez-Luis, I. & Sardiña-Cabrera, G., 2003. *SciELO*. [En línea] Available at: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000300012

Lebwohl M, Ali S., 2001. Treatment of psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy.. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45(4), pp. 487-498.

Lebwohl, M. & Ali, S., 2001. Treatment of psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45(4), pp. 487-498.

Leon, A., Nguyen, A., Letsinger, J. & Koo, J., 2007. An attempt to formulate an evidence-based strategy in the management of moderate-to-severe psoriasis: a review of the efficacy and safety of biologics and prebiologic options. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 8(5), pp. 617-632.

Leon, A., Nguyen, A., Letsinger, J. & Koo, J., 2007. An attempt to formulate an evidence-based strategy in the management of moderate-to-severe psoriasis: a review of the efficacy and safety of biologics and prebiologic options.. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 8(5), pp. 617-632.

López-Alarcón, C. & Lissi, E., 2005. Interaction of pyrogallol red with peroxy radicals. A basis for a simple methodology for the evaluation of antioxidant capabilities. *Free Radical Research*, 39(7), pp. 729-736.

Maciá, M., 2011. *La contribución de la farmacología clínica a la evaluación de la relación beneficioriesgo de los medicamentos*.. Madrid: Sánchez-García P.

Marinoff, M. A., 2006. Las plantas medicinales desde la Biblia a la actualidad.. *Universidad Nacional del Nordeste*.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. & Tuñón, M., 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), pp. 271-278.

McCune, L. & Johns, T., 2002. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest.. *Journal of Ethnopharmacology*., 82(2-3), pp. 197-205.

Medinia, F. y otros, 2015. Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte *Limonium densiflorum* extracts on human cell lines and murine macrophages. *South African Journal of Botany*, 99(1), p. 158–164.

Meneau-Hernández, R. I., 2014. Métodos alternativos en toxicología.. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*., 45(1).

Mercedes-Rodríguez, L. d. I., 2015. Etnobotánica maya: Algunas plantas de uso medicinal en estomatología.. *Revista ADM*, 72(1), pp. 21-25.

Michael, A., Thompson, C. & M., A., 1956. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay.. *Science.*, 123(1), p. 464.

Monfrecola G, Baldo A., 2009. Retinoids and phototherapy for psoriasis.. *The Journal of rheumatology.*, Volumen 83, pp. 71-72.

Monfrecola, G. & Baldo, A., 2009. Retinoids and phototherapy for psoriasis. *The Journal of rheumatology.*, 83(1), pp. 71-72.

Naima, R. y otros, 2015. Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from moroccan *Acacia mollissima* barks. *Industrial Crops and Products*, 70(1), p. 245–52.

Nishikimi, M., Rao, N. A. & Yagi, K., 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2), pp. 849-854.

OECD. , 2015. *OCDE. Mejores políticas para una vida mejor.*. [En línea] Available at: <http://www.oecd.org/centrodemexico/laocde/> [Último acceso: 15 Junio 2016].

OECD, 2005. *OECD no. 34: Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment.*. s.l.:Series on Testing and Assessment..

Okayama, Y., 2005. Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy.*, 4(1), pp. 517-519.

Orellana-Arauco, Á. R., Padilla-Desgarennnes, M. d. C. & Peralta-Pedrero, M. L., 2012. Frecuencia de onicomycosis en pacientes con psoriasis y alteraciones ungueales. *Dermatol Rev Mex* 2012, 56(2), pp. 109-114.

Panagoula, B., Panayioti, M. & Iliopoulou-Georgudaki, J., 2002. Acute toxicity of Tbt and Irgarol in *Artemia salina*. *International Journal of Toxicology*, 21(3), pp. 231-233.

Papadopoulos, A. I., Lazaridou, E., Mauridou, G. & Touraki, M., 2004. Glutathione S-transferase in the branchiopod *Artemia salina*. *Marine Biology*, 144(2), pp. 295-301.

Peña, A., Morales, J., Labastida, C. & Capella, S., 2003. Extracción en fase sólida como una alternativa para el procedimiento de limpieza en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases: Aplicación a organismos marinos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 19(1), pp. 13-23.

Perez Bueno, t., 2015. *Obtención de extractos de plantas medicinales (pagina 2).* [En línea] Available at: <http://m.monografias.com/trabajos66/extractos-plantas->

[medicinales2.shtml](#)

[Último acceso: 13 Agosto 2016].

Persoone, G., Van de Vel, A., Van Steertegem, M. & De Nayer, B., 1989. Predictive value of laboratory test with aquatic invertebrates: influence of experimental conditions.. *Aquatic Toxicology*, 14(2), pp. 149-167.

Pfundt, R. y otros, 2000. TNF-alpha and serum induce SKALP/elafin gene expression in human keratinocytes by a p38 MAP kinase-dependent pathway. *Archives of dermatological research*, 292(4), pp. 180-187.

Pijoan, M., 2003. Medicina y etnobotánica aztecas. *OFFARM*, 22(3), pp. 128-136.

Popov, I. & Lewin, G., 1991. A deficient function of the antioxidative system of the organism as an etiopathogenic factor in psoriasis.. *Med Hypotheses*., 35(1), pp. 229-236.

Porter, L., Hrstich, L. & Chan, B., 1986. The conversion of proanthocyanidins and prodelphinidins to cyanidins and delphinidin.. *Phytochemistry*, 25(1), pp. 223-230.

Prida, A. & Puech, J., 2006. Influence of geographical origin botanical species on the content of extractives in American, French, and East European Oak Woods.. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*., 54(21), pp. 8115-8126.

Puig, L. y otros, 2009. Documento de consenso sobre la evaluación y el tratamiento de la psoriasis moderada/grave del Grupo Español de Psoriasis de la Academia Española de Dermatología y Venereología. *Actas Dermosifiliogr.*, 100(1), pp. 277-86.

Quignard, E.-L.-J. y otros, 2002. *Screening of plants found in amazonas state for lethality towards brine shrimp*. [En línea] Available at: <http://www.scielo.br/pdf/aa/v33n1/1809-4392-aa-33-1-0093.pdf> [Último acceso: 20 Agosto 2016].

Quiñonez, M., Angel, M. & Aleixandre, A., 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 22(1), pp. 76-89.

Ramirez-Herrera, R. & Soto-Ruíz, N. E., 2015. *COFEPRIS. Estudios pre-clínicos y clínicos*. [En línea] Available at: <http://www.cofepris.gob.mx> [Último acceso: 2016 Junio 16].

Ramos-OE, T. y otros, 2013. *“Tratamiento farmacológico para pacientes adultos con psoriasis en placas”*. [En línea] Available at: <http://www.cenetec.salud.gob.mx>

Rapp, Stephen R., Steven R. Feldman, M. Lyn Exum, Alan B. Fleischer, David M. Reboussin., 1999. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 41(3), pp. 401-413.

Rapp, S.-R.y otros, 1999. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases.. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 41(3), pp. 401-413.

Rates, S., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39(1), pp. 603-613.

Repetto, G., del Peso, A. & Zurita, J. L., 2014. *Métodos alternativos a la experimentación animal en la evaluación de la seguridad*. [En línea] Available at: <http://tox.umh.es/aetox/gtema/> [Último acceso: 17 Junio 2016].

Rich, P. & Scher, R. K., 2003. Nail Psoriasis Severity Index: a useful tool for evaluation of nail psoriasis.. *Journal of the American Academy of Dermatology*., 49(2), pp. 206-212.

Rodríguez-Perón, J.-M., Menéndez-López, J.-R. & Trujill-López, Y., 2001. *Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo*. [En línea] Available at: <http://scielo.sld.cu/scielo.php> [Último acceso: 29 Mayo 2016].

Roenigk, H. H. & Maibach, H. I., 1985. *Psoriasis*. s.l.:M. Dekker..

Rowe, J. & Conner, A., 1979. *Extractives in eastern hardwood*.. 18 ed. Wisconsin, United States.: Madison..

Ruch, R. J., Shu-jun, C. & James, E. K., 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Oxford Journald*, 10(6), pp. 1003-1008.

Russell, W. & Burch, R., 1959. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen & Co.

Salomon, J., Szepietowski, J. C. & Proniewicz, A., 2003. Psoriatic nails: a prospective clinical study.. *J Cutan Med Surg*., 7(4), pp. 317-321.

Sánchez-Calero, J., Faure-García, R. & Mitjavila-Cors, M. T., 2012. Efecto de *Rhizophora mangle* L. sobre la producción de anión superóxido en macrófagos murinos RAW 264.7. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(3), pp. 223-232.

Sánchez-Fortún, S., Sanz-Barrera, F. & Barahona-Gomariz, M., 1995. Acute toxicities of selected insecticides to the aquatic arthropod *Artemia salina*.. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(1), pp. 76-82.

Scalbert, A., Monties, B. & Janin, G., 1989. Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *J. Agric. Food Chem.*, 37(5), pp. 1324-1329.

Secretaría de Economía., 2011. *NMX-R-019-SCFI-2011 Sistema armonizado de clasificación y comunicación de peligros de los productos químicos*. México, D.F., s.n.

Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H. & Rocha-Sosa, M., 2003. La participación de los metabolitos secundarios en defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), pp. 355-363.

Shobaili, A. y otros, 2012. Genetic Background Psoriasis. *Int J Health Sci (Qassim)*., 4(1), pp. 23-29.

Silanikove, N., Gilboa, N. & Perevolotsky, A. N. Z., 1996. Goats fed tannin-containing leaves do not exhibit toxic syndromes. *Small Ruminant Research*, 21(3), pp. 195-201.

Simonetti, O. y otros, 1996. Plasma membrane fluidity of keratinocytes of normal and psoriatic skin: a study using fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene (TMA-DPH).. *Arch Dermatol Res*, 288(1), pp. 4-51.

Smirnoff, N. & Cumbes, O., 1996. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes.. *Phytochemistry*, 28(1), pp. 1057-1060.

Sreejayan, N. & Rao, M., 1997. Nitric oxide scavenging by curcuminoids.. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49(1), p. 105–107.

Stevanovic, T., Diou, P.-N. f. & Garcia-Perez, M. E., 2009. Bioactive polyphenols from healthy diets and forest biomass. *Current Nutrition & Food Science*, 5(1), pp. 264-295.

Stevanovic, T. & Perrin, D., 2009. *Extractives*. s.l.:PRUR.

Stowd LC, Yentzer BA, Fleischer AB, Feldman S.R., 2009. Increasing use of more potent treatments for psoriasis.. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 60(3), pp. 478-481..

Stowd, L., Yentzer, B., Fleischer, A. & Feldman, S., 2009. Increasing use of more potent treatments for psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 60(3), pp. 478-481.

Tanew, A. y otros, 1991. Photochemotherapy for severe psoriasis without or in combination with acitretin: a randomized, double-blind comparison study.. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 25(4), pp. 682-684.

Trujillo, Esquivel & Fátima, M., 2015. *Efecto de las infusiones de encino comestibles Quercus sideroxyla y Quercus durifolia sobre marcadores histopatológicos y moleculares en cáncer de colon*. [En línea] Available at: <http://ri.uaq.mx/handle/123456789/2295> [Último acceso: 09 Junio 2016].

Turkmen, N., Sari, F. & Velioglu, Y. S., 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods.. *Food Chemistry*, 99(4), pp. 835-841.

Universidad de Granada, 2015. *Paracelso, "Dosis sola facit venenum"*. [En línea] Available at: http://www.urq.es/~dpto_mlp/ [Último acceso: 9 Septiembre 2016].

Uribe Salas, M. D. & Chávez Carbajal, M. A., 2016. ¿Qué hacen los encinos por nuestra salud?. *Saber más*.

Utas, S. y otros, 2002. Antioxidants potential of propylthiouracil in patients with psoriasis.. *Clinical Biochemistry*, 35(1), pp. 241-246.

Vastano, B. C. y otros, 2000. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), pp. 253-256.

Vázquez-Cabra, B. D., Moreno-Jiménez, M. R. & Rocha-Guzmán, N. E., 2016. Mexican oaks as a potential non-timber resource for Kombucha beverages.. *Revista Chapingo*, 22(1), pp. 73-86.

Vázquez-Cabra, B. D., Moreno-Jiménez, M. R. & Rocha-Guzmán, N. E., 2016. Mexican oaks as a potential non-timber resource for Kombucha beverages.. *Revista Chapingo*, 22(1), pp. 73-86.

Villanueva-Tiburcio, J. E., Condezo-Hoyos, L. A. & Ramirez-Asquieri, E., 2010. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu. *Food Science and Technology (Campinas)*, 30(1).

Viruez-Soto, J.-A., 2008. Descubrimiento de la penicilina. *Scientifica [online]*, 8(1), pp. 78-79.

Yildirim, M., Inaloz, H., Baysal, V. & Delibas, N., 2003. The role of oxidants and antioxidants in psoriasis.. *JEADV*, 17(1), pp. 34-37.

Young, C. N. y otros, 2008. Reactive oxygen species in tumor necrosis factor-alpha-activated primary human keratinocytes: implications for psoriasis and inflammatory skin disease. *The Journal of investigative dermatology*., 128(11), pp. 2606-2614.