

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA



**EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA AGUDA DE UN
EXTRACTO DE QUERCUS SCYTOPHYLLA SOBRE
ARTEMIA FRANCISCANA Y SU EFECTO
HIPOTENSOR EN RATAS WISTAR**

Tesis

para obtener el grado de Licenciatura en Químico
Farmacobiología

Presenta:

P.Q.F.B: Luis Miguel Miranda Vieyra

Director: D.C. María Carmen Bartolomé Camacho

Co-director: D.C. Martha Estrella García Pérez

Morelia, Michoacán Julio de 2020

Dedicatoria

El presente trabajo de investigación va con dedicatoria especial para Dios que ha sido mi mayor inspiración para lograr uno de mis mayores anhelos en mi vida, a mi padre Florentino por su sacrificio y su esfuerzo durante todos estos años y a mi madre Florencia por su amor y ternura, a mis hermanos mi impulso para salir adelante, a todos los docentes que participaron durante mi formación académica y en especial a mi asesora de Tesis.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por darme la vida y esta oportunidad de realizar una profesión que me apasiona

A mis padres por regalarme la mejor herencia que un padre le puede ofrecer a sus hijos

A mis hermanos por que han sido durante estos años mi motivación y mi fortaleza

A mis amigos por hacer agradable y competitiva mi formación universitaria

A mi asesora y co-asesora por haber puesto su confianza en mí para realizar este proyecto juntos y haberme guiado con sus conocimientos

A mi asesora de Tesis por el apoyo constante y por haber tenido toda la paciencia a pesar de las adversidades

A la Doctora Xóchitl por haber apoyado este proyecto con sus conocimientos y habilidades

A la Doctora Alondra por haber estado presente durante todo este tiempo, por su paciencia y apoyo

Al Doctor Daniel por su conocimiento que permitió dar claridad a este trabajo de investigación.

ÍNDICE

ÍNDICE	II
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	3
I. Marco teórico	5
1.1. -Generalidades del género <i>Quercus</i>	5
1.2. El género <i>Quercus</i> en México.....	6
1.3. La importancia de los encinos en México.....	7
1.3.1. Los encinos en la medicina tradicional mexicana	10
1.4. Moléculas bioactivas del Género <i>Quercus</i>	12
1.5. Polifenoles: compuestos con propiedades biológicas	14
1.5.1. Compuestos polifenólicos del género <i>Quercus</i>	15
1.5.2. Propiedades farmacológicas de los compuestos fenólicos de los encinos	16
1.5.3. Propiedades Toxicológicas	17
1.6. Los bioensayos en la toxicología	18
1.7. Estudios de citotoxicidad.....	19
1.7.1. Artemia en estudios de citotoxicidad	21
1.7.2. Artemia: Aspectos biológicos generales	22
1.8. El endotelio vascular.....	25
1.8.1. Función del endotelio vascular	25
1.8.2. Fisiología del endotelio vascular.....	25
1.8.3. Acción del Óxido nítrico.....	27
1.8.4. Fisiopatología del endotelio y Disfunción endotelial.....	28
1.8.5. Vasodilatación producida por Óxido Nítrico	28
1.8.6. Otras funciones del óxido nítrico.....	29
1.9. Mecanismos de relajación.....	30
1.9.1. Óxido nítrico y su mecanismo de relajación.....	30
1.9.2. Prostaciclina y su mecanismo de relajación	32
II. Justificación.....	33
III. Hipótesis	34
IV. Objetivos.....	35
4.1 Objetivo general.....	35
4.2 Objetivos específicos	35
V. Material y métodos.....	36

5.1. Bioensayo con <i>Artemia franciscana</i>	36
5.1.1. Sustancia de Ensayo	36
5.1.2. Agua marina sintética.	36
5.1.3. Material Biológico	36
5.1.4. Determinación de la toxicidad aguda de los extractos etanólico y acuoso de cortezas de <i>Quercus scytophilla</i> sobre nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	37
5.2. Estudio de contracción en arterias aisladas.	37
5.3. Análisis estadístico	38
VI. Resultados	40
6.1. Resultados de Bioensayo de toxicidad aguda en <i>Artemia franciscana</i>	40
6.2. Resultados del extracto etanólico y acuoso en Arteria aorta.	43
VII. Discusión	45
VIII. ConclusiONES	50
IX. Recomendaciones	50
X. Bibliografía.....	51

RESUMEN

En países como México, poseedores de una alta biodiversidad, resulta especialmente importante el estudio de las plantas, extractos o sustancias puras que presentan significativa actividad terapéutica. Dentro de las múltiples estrategias que se pueden utilizar para la selección de especies vegetales como fuentes de principios activos, el estudio de la letalidad que producen los extractos sobre larvas de *Artemia*, ha demostrado ser útil para seleccionar aquellas que producen baja o nula citotoxicidad. Por otro lado, el consumo de productos de origen botánico no presenta, en general, estudios toxicológicos ni farmacológicos, pudiendo circunstancialmente ocasionar efectos secundarios de alto riesgo sobre la población. Este es el caso concreto de la corteza de *Quercus scytophylla*, por lo que en el presente trabajo se realizó una valoración de la toxicidad aguda utilizando bioensayos con un bioindicador representante del zooplancton (*Artemia franciscana*) que nos permite evaluar no sólo la citotoxicidad sino también el impacto toxicológico agudo sobre el ecosistema acuático. Los resultados obtenidos del estudio de la LC₅₀ sobre nauplios de *Artemia franciscana* a 24h muestran en el extracto acuoso de *Quercus scytophylla* una LC₅₀ de 1.71 g/L y en el extracto etanólico una LC₅₀ de 2.39 g/L, observándose que el extracto acuoso fue más tóxico que el extracto etanólico, aunque dentro de la clasificación de la EPA, ambos extractos se clasificaron como no nocivos mostrando efectos citotóxicos de una baja toxicidad sobre este crustáceo (>1000 µg/mL). Al realizar el estudio de la valoración de la capacidad terapéutica del extracto de *Quercus scytophylla* sobre la arteria aorta torácica de ratas Wistar machos, el cual se obtuvo midiendo la capacidad de actuación sobre la función del músculo liso vascular con y sin endotelio, los resultados obtenidos muestran que ambos extractos son vasoconstrictores en presencia de endotelio, pero se observa un efecto vasodilatador en el extracto etanólico en ausencia de endotelio.

Palabras clave: *Quercus scytophylla*, bioensayo, endotelio, músculo liso vascular.

ABSTRACT

In countries such as Mexico, with a high biodiversity, the study of plants, extracts or pure substances that have significant therapeutic activity is especially important. Within the multiple strategies that can be used for the selection of plant species as sources of active ingredients; the study of the lethality of extracts on *Artemia* larvae has proven useful for such purposes. The consumption of botanical products that have not been evaluated toxicologically or pharmacologically, can cause side effects on the population. This is the case of the *Quercus scytophylla* bark, so in this work an assessment of the acute toxicity was performed using a bioindicator representative of zooplankton (*Artemia franciscana*) allowing to evaluate not only cytotoxicity but also the acute toxicological impact on the aquatic ecosystem. The results obtained from the LC₅₀ study on *Artemia franciscana* nauplii at 24h show that the aqueous extract from *Quercus scytophylla* had a LC₅₀ of 1.71 g / L whereas the ethanolic extract showed a LC₅₀ of 2.39 g / L. According to these results, the aqueous extract was considered to be more toxic than the ethanolic extract, although within the EPA classification, both extracts were classified as non-harmful. Regarding the study of the therapeutic capacity of *Quercus scytophylla* extract on the thoracic aortic artery of male Wistar rats, which was evaluated by measuring the ability to act on vascular smooth muscle function with and without endothelium, both extracts were vasoconstrictors in the presence of endothelium, but a vasodilator effect of the ethanolic extract was observed in the absence of endothelium.

Keywords: *Quercus scytophylla*, bioassay, endothelium, vascular smooth muscle.

INTRODUCCIÓN

En el Estado de Michoacán atravesado en parte por la Sierra Madre Occidental podemos encontrar una amplia diversidad de bosques de pino-encino (Sánchez-González, 2008). Como parte integrante de estos bosques se encuentra la especie *Quercus scytophylla*, un encino perteneciente a la familia *Fagaceae* (Arámbula-Salazar et al., 2010) con un alto valor ecológico, etnofarmacológico, económico y cultural (Bello-González, M., 2009.) por ello el estudio de esta especie es de relevancia para lograr fortalecer el conocimiento acerca de sus posibles efectos en la salud humana.

El estudio de los encinos es además de gran importancia ya que constituyen el segundo recurso forestal más importante de México, generando ingresos económicos importantes para el país. Los encinos no son solo utilizados por la industria forestal, sino que son empleados por la medicina tradicional mexicana para tratar diferentes padecimientos como problemas gastrointestinales, trastornos circulatorios, respiratorios y dermatológicos (Domínguez-Vázquez and Castro-Ramírez, 2015).

Considerando que la medicina tradicional está presente como una alternativa importante en los servicios de atención primaria de la salud en México (Barrera-Catalán et al., 2015) resulta de vital importancia reforzar la investigación acerca de las propiedades toxicológicas y farmacológicas de las plantas medicinales con vistas a demostrar sus efectos sobre la salud y/o anticipar soluciones ante intoxicaciones agudas.

En ese sentido, las pruebas *in vitro* representan una etapa importante durante el desarrollo de nuevos medicamentos previo a las pruebas *in vivo*; ya que estas pruebas son relativamente más económicas, se pueden efectuar en un periodo más corto de tiempo y son altamente sensibles. En la última década, se han incorporado algunos ensayos de gran utilidad y eficacia que requieren pequeñas cantidades de muestras y permiten la evaluación rápida de la toxicidad de extractos crudos y fracciones.

Un lugar sobresaliente dentro de estos bioensayos lo ocupa el de *Artemia franciscana*., en donde se utilizan organismos vivos para detectar la presencia y efectos de una o más sustancias tóxicas, así como determinar el límite de tolerancia a dichas sustancias. Estos ensayos permiten visualizar la relación riesgo-beneficio que implicará el uso de extractos vegetales como alternativa medicinal.

Además del conocimiento de las propiedades toxicológicas de los extractos naturales, resulta de vital importancia evaluar las acciones farmacológicas con vistas a avalar su uso tradicional por parte de la población. En la medicina tradicional mexicana se reporta el uso de los encinos para mejorar la circulación (Drózdź and Pyrzynska, 2018) sanguínea, mientras que la literatura científica demuestra que extractos de especies pertenecientes al género *Quercus* presentan propiedades cardioprotectoras, hipotensoras, antilipídemicas y antiaterogénicas (Drózdź and Pyrzynska, 2018). El renovado interés por las especies del género *Quercus* como fuente de moléculas bioactivas y la falta de evaluaciones farmacológicas y toxicológicas de especies mexicanas, ha llevado al presente trabajo en el que se planteó en una primera etapa determinar la actividad citotóxica *in vitro* del extracto acuoso y etanólico de cortezas de *Quercus scytophylla* sobre *Artemia franciscana* para luego verificar el efecto vasorrelajante en músculo liso arterial en ratas Wistar adulto macho.

I. MARCO TEÓRICO

1.1. Generalidades del género *Quercus*

La familia Fagaceae comprende entre 8 a 10 géneros y más de 900 especies donde el género *Quercus* presenta una gran diversidad con alrededor de 400 especies que lo conforman (Ruiz-Aquino et al., 2016). Los encinos son arboles leñosos de gran importancia ecológica y económica, y de amplia distribución a nivel mundial. Se encuentran en las regiones montañosas del hemisferio norte: en Europa, en el Sureste de Asia y en el Noreste de África. En el continente americano su distribución abarca desde el sur de Canadá hasta Colombia. La mayor diversidad se encuentra en bosques templados, sin embargo, pueden encontrarse en bosques tropicales, chaparrales y matorrales (Sabás-Rosales et al., 2015).

Los encinos del continente americano se clasifican en tres secciones: *Quercus* (encinos blancos) *Lobatae* (encinos rojos) y *Protobalanus* (encinos de copa dorada). De los encinos antes mencionados *Quercus* presenta la mayor diversidad y la mayor distribución en el continente americano y en México en particular (Sabás-Rosales et al., 2015). Son 250 especies que se contemplan en el continente americano, de las que se tienen registro 61 (Ruiz-Aquino et al., 2016). Se reconocen dos centros de diversidad de *Quercus* a nivel mundial, uno en América y otro en Asia (Sabás-Rosales et al., 2015). El centro de diversidad de América más grande se encuentra en México, donde se estima existen 161 especies (Sabás-Rosales et al., 2015) de las cuales 109 se consideran endémicas (Gorgonio-Ramírez et al., 2017), distribuidas principalmente a lo largo de cadenas montañosas templadas y subhúmedas y son junto con el género *Pinus*, los árboles dominantes del dosel en ecosistemas templados. Por lo anterior, se reconoce su importancia en México como: 1) especies ejes, en la preservación de la biodiversidad asociada, 2) formadores de suelos forestales y reciclaje de nutrientes, 3) preservadores de mantos acuíferos in situ y a distancia y 4) reguladores del clima y captura de carbono (Gorgonio-Ramírez et al., 2017).

La mayoría de los encinos en México se encuentran en zonas montañosas con clima templado o templados subhúmedo, y más de 95 % de las especies se encuentran entre los 1200 msnm y 2800 msnm (Ruiz-Aquino et al., 2016), la mayor riqueza de especies de *Quercus* se concentra en las montañas del sur.

1.2. El género *Quercus* en México

Los encinos, son un grupo de plantas que se distribuye ampliamente a lo largo del territorio mexicano. Representan un conjunto de arbustos y de árboles con gran valor ecológico, económico y cultural, por lo que su adecuado manejo y conservación deberían ser considerado como un propósito primordial.

Los encinos comparten ciertas características biológicas en común, por ejemplo: tallos leñosos, hojas con consistencia similar al cuero (coriáceas o duras) y presencia de bellotas. Su forma de crecimiento es comúnmente como un árbol (con alturas de 3 a 40 m) aunque algunos son arbustos (con alturas de 10 a 60 cm). Su desarrollo es lento, causa por la cual son de larga vida, y crecen principalmente en bosques templados, aunque también pueden hallarse en matorrales, pastizales y de forma intercalada, en algunas selvas secas (Bello-González, M., 2009).

Las hojas se caracterizan por tener diferentes tipos de ápice (punta de la hoja), base de la hoja, número de nervaduras, margen (o borde de la hoja), textura, tamaño y colores, propiedades morfológicas que son empleadas en la taxonomía para su clasificación científica (Bello-González, M., 2009).

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 exclusivas al país (endémicas), es decir el 68% de los encinos del continente americano sólo se encuentra en México. En contraste, Estados Unidos y Canadá sólo poseen 87 especies, 7 de ellas 52 especies cruzan la frontera encontrándose también en México, es decir, de los bosques templados de encino, pino-encino, mesófilos de montaña y, ocasionalmente, matorrales y bosques tropicales caducifolios. Los bosques de encinos se

encuentran ampliamente distribuidos en los macizos montañosos de México, y cubren, aproximadamente 5.5% de la superficie total del país, hallándose la mayor diversidad de especies en un intervalo altitudinal que varía entre los 1,200 a 2,800 metros sobre el nivel del mar, aunque es posible encontrar especies desde los 200 hasta 3,500 m de altitud (Bello-González, M., 2009).

Los estados con mayor riqueza de encinos son Nuevo León, Veracruz y Oaxaca (Figura 1). Sin embargo, las entidades con más información científica sobre este tipo de plantas son Jalisco, Guerrero, México y Michoacán. De manera natural el único estado sin encinos es Quintana Roo (Bello-González, M., 2009).



Madrean Pine-Oak Woodlands Hotspot

Figura 1. Distribución Geográfica de los bosques pino-encino en territorio mexicano

1.3. La importancia de los encinos en México

Los encinos poseen múltiples aplicaciones entre las que se destaca su utilización como materia prima básica para la construcción, elaboración de carbón, elaboración de mangos de diversas herramientas, instrumentos e implementos agrícolas, confección de artesanías locales y la elaboración de muebles. A nivel mundial, la madera de los encinos es considerada de alta

calidad, por lo que resulta importante para la economía de algunos de los países europeos (Bello-González, M., 2009).

Los encinos constituyen un recurso natural renovable que sirve de alimento y para diversas aplicaciones en el sector industrial. En el pasado los frutos constituyeron una fuente alimenticia importante para el hombre, aunque su uso ha disminuido. En la actualidad, las bellotas son empleadas como alimento para el ganado porcino. En ciertos lugares las bellotas de sabor dulce se consumen crudas, pero su exceso puede provocar una ligera intoxicación mientras que en otros lugares son tostadas y molidas para fabricar una bebida parecida al café. Por otro lado, las hojas son utilizadas como condimentos. También la corteza es ampliamente utilizada en trabajos de peletería debido a la alta concentración de taninos de peletería debido a la alta concentración de taninos que poseen(Bello-González, M., 2009).

Desde la visión ecológica, los encinos son proveedores de servicios ambientales, dado que: producen oxígeno, capturan bióxido de carbono, filtran el ruido, reducen la erosión del suelo, infiltran el agua al subsuelo, regulan la temperatura atmosférica y son hospederos naturales que alojan en sus cortezas, ramas, hojas y flores, a numerosas especies de ardillas, pájaros, avispas, abejas, moscas, escarabajos, orquídeas, líquenes, bromelias, helechos y plantas trepadoras(Bello-González, M., 2009).

Esto hace que un solo encino actúe por sí mismo como un ecosistema en miniatura, en donde los diferentes organismos y procesos ecológicos se relacionan entre sí a través de diversas relaciones como la depredación, la herbívora, la simbiosis y la reproducción. La evolución biológica y conservación de los encinos afecta de manera directa a todos los demás seres vivos que en ellos habitan(Bello-González, M., 2009).

Desde el punto de vista médico, algunas gentes mastican los pedazos de corteza para curar y endurecer encías o calmar dolencias dentales. Mientras que algunas regiones, las hojas son empleadas como antidiarreicos y astringentes. Los amentos de algunas especies son empleados como calmantes contra el vértigo y la epilepsia. Por último, un aspecto desagradable

de los encinos es que su polen figura entre los más comunes alérgenos naturales para personas altamente sensibles a las enzimas que libera el polen. Sin embargo, no se han realizado estudios para evaluar cuáles son las especies de encino que provocan dichas alergias, lo que esto abre un campo de investigación importante en el área médica para entender los mecanismos de acción y cómo contrarrestarlos(Bello-González, M., 2009). Las características de especies mexicanas como *Quercus scytophylla* se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de *Quercus scytophylla*. (Bello-González, M., 2009).

<i>Quercus scytophylla</i>  Figura 1. <i>Quercus scytophylla</i>(Bello-González, M., 2009).	
Nombre común:	encino blanco, encino prieto, encino rosillo y encino yesca.
Tamaño del árbol:	árbol de 6 a 20 m de altura y con diámetro del tronco de 30 a 50 cm.
Hoja:	oblanceolada a lanceolada de 6 a 17 cm de largo por 2.5 a 11.5 cm de ancho; margen con 3 a 7 aristas a cada lado; haz verde olivo lustroso; envés blanquecino y tomentoso.
Corteza:	café rojizo a negra.
Fruto:	anual y solitario; bellota ovoide de 10 a 15 mm de largo por 9 mm de diámetro.
Usos:	leña; fabricación de tarimas, cajas y extracción de celulosa para papel.
Manejo:	no hay programas de manejo para su aprovechamiento.
Mecanismo de propagación:	por bellotas producidas de mayo a octubre.

Estado de conservación:	en peligro debido a su distribución restringida y transformación del hábitat por tala y huerto de aguacate.
Hábitat:	barrancas y laderas, en bosque de pino-encino y bosque mesófilo de montaña entre 1,500 a 2,500 msnm y sobre suelos pedregosos.
Distribución geográfica:	endémica de México; se distribuye en Chiapas, Chihuahua, Durango, Guerrero, Jalisco, México, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, y Sonora.

1.3.1. Los encinos en la medicina tradicional mexicana

Desde tiempos prehistóricos, los seres humanos han usado productos naturales, como plantas, animales, microorganismos y organismos marinos, en medicamentos para aliviar y tratar enfermedades. De acuerdo con los registros fósiles, el uso humano de las plantas como medicamentos puede rastrearse al menos 60,000 años (Yuan et al., 2016).

En la actualidad, el estudio etnobotánico constituye una actividad importante en el área de la investigación y desarrollo de fármacos puesto que algunos reportes afirman que aproximadamente 40% de los productos farmacéuticos que se consumen en los países desarrollados proceden de fuentes naturales (McGonigle, 2016), principalmente de las plantas.

En México, la mayor parte del conocimiento tradicional que se tiene acerca de las plantas medicinales proviene desde la época prehispánica y actualmente diversos grupos étnicos lo conservan. Desde hace más de 30 años ha surgido la necesidad de integrar las medicinas tradicionales dentro de los sistemas oficiales para mejorar la calidad de vida de los pacientes esto por razones de orden cultural y económico (McGonigle, 2016). Los efectos terapéuticos se deben al contenido de diferentes metabolitos secundarios como los aceites esenciales, taninos, ácidos fenólicos, sesquiterpenlactonas, cetonas y flavonoides, entre otros (McGonigle, 2016).

México posee una rica tradición en el empleo de las plantas medicinales entre sus varias prácticas curativas populares. El primer libro de herbolaria medicinal azteca y una de las más importantes fuentes bibliográficas

históricas en América en medicina, lleva por nombre “Libro de las yerbas medicinales de los indios”, que se conociera cuatro siglos después como Códice Badiano (Códice De la Cruz-Badiano), es una obra en la que se describen más de 150 plantas nativas de México y donde se constata su uso medicinal. Se calcula que la flora medicinal mexicana contiene entre 3,000 y 5,000 plantas que tienen potencial terapéutico. Un total de 3,000 especies han sido compiladas en un atlas de plantas medicinales empleadas por diversos grupos étnicos. Increíblemente, aproximadamente el 1% de las plantas medicinales han sido estudiadas a fondo en sus propiedades medicinales. Por lo tanto, es claro que debe realizarse una mayor investigación clínica y etnobotánica, en virtud de elucidar el posible beneficio medicinal de estas plantas (Domínguez-Vázquez and Castro-Ramírez, 2015).

México es uno de los países de América con mayor tradición ancestral y riqueza en el uso de la herbolaria medicinal, donde se registran poco más de 3 000 especies que se emplean en remedios naturales(Vázquez-Cabra et al., 2016). No obstante, son pocas las investigaciones en el uso y manejo de las plantas medicinales, y, por tanto, hay escasa información etnobotánica en este tema(Luna José et al., 2003). La información que se pueda recopilar en las diversas regiones del país tendría relevancia etnobotánica y serviría para definir estrategias que mejoren el aprovechamiento y manejo de los recursos de la flora medicinal.

Los primeros análisis químicos de la corteza del género *Quercus* en México, fueron realizados en la primera década del siglo XX por los médicos y farmacólogos del Instituto Médico Nacional, como parte de los esfuerzos que se hacían entonces para la integración de la Farmacopea Nacional Mexicana. La estructura vegetal preferencialmente utilizada que reportan es la corteza como fuente rica en sustancias astringentes, además de la bellota como sustituto del café.

El uso medicinal de especies del género *Quercus* ha sido registrado en la literatura. Es así que especies como *Q. crassifolia*, *Q. rugosa* y *Q. affinis* se usan con fines medicinales, fundamentalmente sus cortezas, hojas, flores y

raíces (González ME, et al., 2004). La tabla 2 muestra algunas de las propiedades medicinales atribuidas a representantes del género *Quercus*.

Tabla 2. Propiedades medicinales de representantes del género *Quercus*. (Valencia, A. 2004).

Especie	Uso
<i>Q. castanea</i>	Antidiarreico y astringente
<i>Q. crassifolia</i>	Antimicrobiano y desinflamatorio
<i>Q. crassipes</i>	Amacizar los dientes, antimicrobiano y desinflamatorio
<i>Quercus durifolia</i>	Para amacizar los dientes se mastica la corteza o se hacen enjuagues bucales
<i>Q. eduardii</i>	Infusión de la corteza para aliviar el dolor de muelas
<i>Q. emoryi</i>	Gárgaras con infusión de corteza para aliviar el dolor de garganta Infusión de las hojas para dolor de pulmones
<i>Q. grisea</i>	La médula y la madera son usadas contra el cáncer
<i>Q. hartwegii</i>	Combatir la presión alta
<i>Q. magnoliifolia</i>	Curar granos
<i>Q. obtusata</i>	Uso contra los reumas
<i>Q. resinosa</i>	Uso junto con flores de mala mujer (<i>Solanum rostratum</i>) para el cáncer. Control de diabetes junto con ramas de hierba del negro (<i>Sphaeralcea angustifolia</i>)

Los informes etnobotánicos mencionan que las infusiones de algunas especies de *Quercus* en combinación con otras plantas, como flores amarillas de *Solanum rostratum* Dunal, muestran efectos anticancerígenos en pacientes con cáncer gástrico, cuando las consumen regularmente (Alonso-Castro et al., 2011). Algunas personas mastican pedazos de corteza o bellotas para curar y endurecer encías o calmar dolencias dentales, mientras que en algunas regiones del estado, las hojas y corteza son empleadas como antidiarreicos, disentería, úlcera estomacal, gastritis, hemorragia intestinal e inflamación, cáncer de estómago y hemorroides. Así mismo, la corteza la utilizan en problemas de la piel como úlceras, llagas, erupciones, granos, infecciones, quemaduras, heridas y piel flácida.

1.4. Moléculas bioactivas del Género *Quercus*

Investigaciones más específicas en relación con estudios antiinflamatorios de extractos acuosos de encino se llevaron a cabo por Gharzouli, Khennouf, Amira, y Gharzouli (1999). Ellos demostraron las propiedades citoprotectoras de extractos acuosos de la corteza de raíz de *Q.*

ilex Liebm. en comparación con los extractos acuosos de hojas de *Punica granatum* Linneo y *Artemisia herba-alba* Asso. contra daños causados por etanol en el estómago, teniendo el ácido tánico como control positivo. También documentaron que el ácido tánico junto con otros polifenoles, tales como quercetina y ácido elágico, pueden inhibir la bomba de protones presente en las células parietales y así participar en la protección del estómago contra agentes nocivos. En el mismo estudio, Gharzouli et al. (1999) obtuvieron contenidos de fenólicos oligoméricos altos de extractos acuosos de *Q. ilex* y *P. granatum* (2.33 a 4.41 mg·mL⁻¹), mientras que en las hojas de *A. alba* solo encontraron flavonoides monoméricos (0.33 a 0.51 mg·mL⁻¹). Estudios sobre la composición química de *Quercus infectoria*, tradicionalmente utilizada para el tratamiento de heridas o quemaduras asociadas con infecciones bacterianas, han reportado galotaninos y ácido elágico en una proporción de 60 a 70 % (Vázquez-Cabra et al., 2016). Se ha reportado que estos compuestos tienen actividad astringente, antidiabética, anestésica local, antibacteriana, antiviral y antiinflamatoria, y que actúan como buenos agentes de protección contra el daño oxidativo de los lípidos y proteínas (Charrier, Marques, & Haluk, 1992).

En estudios adicionales hemos dilucidado el potencial de encino como fuente sostenible de productos de alto valor añadido, como resultado de sus propiedades nutraceuticas. Se han reportado actividades antioxidantes y anticancerígenas de fitoquímicos presentes en infusiones de hojas de encino, y mecanismos de prevención del cáncer con fitoquímicos de encino que tienen potencial terapéutico en modelos in vitro de células humanas (Rocha-Guzmán et al., 2009) y modelos in vivo utilizando ratas SpragueDawley (Moreno-Jiménez et al, 2014; Rocha-Guzmán et al., 2012). También se han identificado la actividad antitopoisomerasa en modelos in vitro utilizando levadura mutada, y actividades antimicrobianas contra patógenos entéricos (Sánchez-Burgos et al., 2013). Algunas alternativas para la preparación de productos alimenticios que contienen compuestos fenólicos provenientes de encinos que han mostrado un alto potencial cardioprotector han sido investigadas, especialmente en especies de *Q. resinosa* (Rivas-Arreola et al., 2010). Recientemente se demostró un efecto gastroprotector importante contra el

daño inducido por productos químicos en alimentos y medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en modelos de células intestinales humanas (Sánchez-Burgos et al., 2013). La edad o grado de madurez de las hojas de encino determina el contenido de fenoles totales extraíbles; Makkar, Dawra, y Singh (1991) realizaron estudios en varias especies de *Quercus* y observaron que las hojas más jóvenes mostraron dos o tres veces más contenidos fenólicos (20 a 284 mg·g⁻¹) en comparación con las hojas maduras (8 a 125 mg·g⁻¹). Al parecer, el grado de polimerización aumenta con la edad, así como el contenido de proteína y fenólicos; al mismo tiempo, las actividades biológicas cambian a medida que se convierten en hojas maduras. Por lo tanto, el grado de polimerización de los polifenoles determina la capacidad antioxidante y diversas características de la materia vegetal que se reflejarán en su respuesta biológica (Vázquez-Cabra et al., 2016).

1.5. Polifenoles: compuestos con propiedades biológicas

Los polifenoles son micronutrientes abundantes en nuestra dieta, y está surgiendo evidencia de su papel en la prevención de enfermedades degenerativas como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Liebeke et al., 2015) (Valencia-Avilés et al., 2017). Los efectos en la salud de los polifenoles dependen de la cantidad consumida y de su biodisponibilidad (Rtibi et al., 2017).

Durante los últimos 10 años, los investigadores y los fabricantes de alimentos se han interesado cada vez más en los polifenoles. La razón principal de este interés es el reconocimiento de las propiedades nutracéuticas de los polifenoles, su gran abundancia en nuestra dieta y su posible papel en la prevención de diversas enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Liebeke et al., 2015) (Valencia-Avilés et al., 2017). Además, los polifenoles, que constituyen los principios activos que se encuentran en muchas plantas medicinales, modulan la actividad de una amplia gama de enzimas y receptores celulares (Drózdź and Pyrzynska, 2018). De esta manera, además de tener propiedades antioxidantes, los

polifenoles tienen otras acciones biológicas específicas que aún no se conocen bien.

El conocimiento de la biodisponibilidad y el metabolismo de los diversos polifenoles es necesario para evaluar su actividad biológica dentro de los tejidos diana. Los tipos y la distribución de los polifenoles en los alimentos y la biodisponibilidad de los polifenoles.

Varios miles de moléculas que tienen una estructura de polifenol (es decir, varios grupos hidroxilo en anillos aromáticos) se han identificado en plantas superiores, y varios cientos se encuentran en plantas comestibles. Estas moléculas son metabolitos secundarios de las plantas y generalmente están involucradas en la defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión por agentes patógenos (Sánchez-Burgos et al., 2013). Estos compuestos pueden clasificarse en diferentes grupos en función del número de anillos de fenol que contienen y de los elementos estructurales que los unen entre sí. Se hacen así distinciones entre los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos. Los flavonoides, que comparten una estructura común que consta de 2 anillos aromáticos que están unidos por 3 átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado, pueden dividirse en 6 subclases en función del tipo de heterociclo involucrado: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavanoles (catequinas y proantocianidinas). Además de esta diversidad, los polifenoles pueden estar asociados con varios carbohidratos y ácidos orgánicos y entre sí.

1.5.1. Compuestos polifenólicos del género Quercus

Se sabe que la corteza también acumula grandes cantidades de compuestos polifenólicos que exhiben una amplia gama de efectos biológicos, que incluyen actividad antioxidante, antibacteriana y antiinflamatoria (Ferreira et al. 2015 ; Dedrie et al. 2015). La corteza de roble, debido a su valiosa composición química, se ha utilizado para el tratamiento de heridas y enfermedades de la piel (Drózdź and Pyrzynska, 2018). El género Quercus es una fuente importante de flavonoides principalmente de catequina, epicatequina, epigallocatequina, galato de epigallocatequina, gallocatequina,

kaempferol, luteolina, miricetina, naringenina y quercetin (Arbeláez et al., 2018) (Esquivel-García et al., 2018). Muchas de estas moléculas son reconocidas por sus propiedades cardioprotectoras, antioxidantes e hipotensoras (Arbeláez et al., 2018).

Eso es extremadamente importante teniendo en cuenta que estos compuestos están presentes en tejidos como la corteza y las ramitas, considerados residuos de la explotación forestal. El uso de estos desechos como fuente de flavonoides podría contribuir al desarrollo de nuevos productos farmacéuticos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares de alta prevalencia.

1.5.2 Propiedades farmacológicas de los compuestos fenólicos de los encinos

Las sustancias responsables de las cualidades astringentes del tejido vegetal son dadas por compuestos polifenólicos llamados taninos, los que 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 (contraen los tejidos) y antiinflamatorias (reducen la inflamación).

Los estudios señalan que la función cicatrizante de los taninos se produce por su capacidad de formar complejos con las proteínas, precipitándolas, lo que crea un medio seco que impide el desarrollo de las bacterias, favoreciendo así la formación de las costras; también reaccionan con las proteínas constituyentes de la piel y mucosas, por lo que constriñen a los vasos sanguíneos ayudando en la coagulación de la sangre, contribuyendo de esta manera con la curación de las heridas; misma razón por la que son empleados en los tratamientos antiinflamatorios.

Se han realizado varios estudios fitoquímicos y biológicos que revelan actividades antioxidantes y antidiabéticas de *Quercus sp.*, con compuestos triterpénicos y fenólicos informados de las flores y la corteza,

respectivamente (Valencia-Avilés et al., 2018) (Youn et al., 2017). Sin embargo, la actividad antiinflamatoria, la inhibición de citoquinas y la actividad anti-urolitiasis de *Quercus* aún no se han examinado en detalle (Youn et al., 2017).

1.5.3 Propiedades Toxicológicas

A pesar de las características beneficiosas para la salud de los compuestos polifenólicos, la ingesta elevada y crónica de estas moléculas consumidas normalmente en la dieta diaria puede resultar en efectos adversos negativos para la salud. Por ejemplo, algunos **taninos** pueden ocasionar efectos antinutricionales debido a su capacidad como agentes quelantes. Los polifenoles pueden interferir en la absorción del hierro consumido en los alimentos de la dieta diaria y provocar anemia.

Se ha reportado que los polifenoles pueden alcanzar concentraciones tóxicas si su ingesta se encuentra entre el 1% y 5% total de la dieta diaria, no obstante en condiciones normales, lo habitual en una persona es ingerir, aproximadamente entre 25 mg y 1 g por día.

Debido al interés suscitado por estas moléculas en cuanto a su bioactividad, que las convierte en candidatas para el desarrollo de nuevos productos, en años recientes se han realizados diversos estudios toxicológicos para determinar su toxicidad con el objetivo de garantizar la seguridad de su consumo humano.

En 2015, Soto y colaboradores evaluaron la toxicidad de la infusión de las hojas de *Quercus sp.*, obteniendo como resultado de dicha infusión , administrada en larvas de *A. salina* una DL50 de 1070.42 mcg/mL. En base a estos resultados llegó a la conclusión, de que el extracto no es tóxico y es seguro para el consumo como agente terapéutico en el tratamiento de la diabetes *mellitus*. Un estudio toxicológico oral subagudo efectuado por Valencia y colaboradores en 2019 muestra que la fracción acetato de etilo derivada del extracto acuoso de *Quercus crassifolia* es capaz de inducir daño renal en ratas wistar administradas diariamente con este extracto durante 28 días, con una NOAEL de 11 mg/kg (Valencia-Avilés., 2019).

En los últimos años los métodos alternativos de experimentación animal han progresado, siendo hoy en día los métodos *in vitro*, *in silico* e *in vivo* muy importantes en la evaluación del perfil toxicológico de nuevos compuestos. Estos métodos son muy utilizados para la evaluación de moléculas y son aceptados por las entidades regulatorias como la OCDE, FDA y la EPA, debido a que pueden reducir, refinar y/o sustituir la experimentación *in vivo* en animales. Los métodos alternativos se fundamentan en el principio de las 3 R (refinamiento, reducción y reemplazo).

1.6. Los bioensayos en la toxicología

Un Bioensayo o ensayo biológico es un tipo de experimento científico que investiga los efectos de una sustancia en un órgano aislado o en un organismo vivo. Es esencial en el desarrollo de nuevas drogas y monitorización de poluentes en el medio ambiente. Los bioensayos pueden ser cuantitativos o cualitativos e incluso a veces, mixtos.

- ✓ Bioensayos cualitativos: usados para evaluar los efectos físicos de una sustancia que no puede ser cuantificada, tales como en un desarrollo anormal o deformidad.
- ✓ Bioensayos cuantitativos: estimación de la concentración o potencia de una sustancia por la medida de la respuesta biológica que ella produce. Generalmente hay el uso de bioestadística.

Una prueba de toxicidad es un ensayo en el cual un organismo o grupo de organismos son expuestos a un agente (químico, físico o biológico) para establecer y medir una respuesta previamente seleccionada. En una prueba de toxicidad, usualmente se mide la proporción de organismos afectados por su exposición a concentraciones específicas de dichas sustancias y aguas (SEGOB, 2010). Esta respuesta se valora mediante la cuantificación del cambio en la característica o la ocurrencia de un determinado fenómeno (Barreto & Peralta, 2009). Los efectos observados pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, y son evaluados a través la reacción de los organismos, como son muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos. Los efectos pueden

manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades. Dichas pruebas sirven como herramientas que al ser usadas juntamente con las mediciones químicas y ecológicas, permiten identificar, cuantificar y generar criterios para el control de la descarga de contaminantes tóxicos (Díaz, et al., 2004a). En sentido toxicológico, los bioensayos son pruebas para medir la potencia de una sustancia fisiológicamente activa, generalmente de origen desconocido, y son diseñados para medir los efectos biológicos de uno o más sustancias químicas sobre una o más especies de organismos (López, 2009). También se cuenta con grupos control los cuales no se exponen a la sustancia química en estudio. Se debe considerar que el efecto tóxico de una sustancia sobre los sistemas biológicos es el resultado de la acción combinada de todas las sustancias presentes en el medio, incluso aquellas que no son tóxicas por naturaleza, pero que afectan las propiedades químicas o físicas del sistema y en consecuencia, las condiciones de vida de los organismos. Además, se debe tener en cuenta aquellos efectos no directamente relacionados con la sustancia tóxica como el daño producido por cambios en la temperatura o por radiación (Díaz, et al., 2004) y que la complejidad y heterogeneidad de los materiales dan lugar a una variedad de problemas experimentales cuando se practican los ensayos. Estos pueden estar relacionados con la inestabilidad de la muestra debido a diferentes reacciones y procesos, como separación de fases, sedimentación, volatilización, hidrólisis, fotodegradación, precipitación, biodegradación, biotransformación e incorporación por los organismos (Ronco, et al., 2004). Aunque existe un limitado alcance de la información proveniente de los ensayos de toxicidad, los estudios con organismos en laboratorio, en condiciones controladas y estandarizadas para la evaluación de respuestas, han venido siendo las fuentes de información predominantes para la evaluación de los efectos de los tóxicos (Ronco, et al., 2004).

1.7. Estudios de citotoxicidad

El término "alternativa a la experimentación animal" puede llevar a confusión y sugerir que se refiere sólo a aquellos métodos que los sustituyen

en la investigación, como, por ejemplo, los métodos in vitro. En realidad, se consideran bajo este concepto todos aquellos que cumplen con alguno de los postulados del principio de las tres R. (Halder, et al; 2002)

Este principio surgió en 1959, cuando Russell y Burch publicaron el libro "The Principles of Humane Experimental Technique". Las tres R se refieren a reemplazar los animales de experimentación por otros métodos que no impliquen su uso, reducir su número cuando sea necesario utilizarlos y refinar las técnicas para aminorar su sufrimiento. Según dichos autores, lo ideal es reemplazar los animales por otros métodos, aunque, en muchos casos, por la necesidad de experimentar con ellos, sólo se pueda aspirar a la reducción y el refinamiento.(Huggins.;2003)

Dentro de la batería de ensayos in vitro como métodos de toxicología alternativa útiles y necesarios para el registro o solicitud de ensayos clínicos de una sustancia dada se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad, capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular (Repetto.,2002).

La citotoxicidad celular, por tanto, se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado. A partir de aquí, diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas in vitro para predecir los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos. Dentro de la batería de ensayos in vitro como métodos de toxicología alternativa útiles y necesarios para el registro o solicitud de ensayos clínicos de una sustancia dada se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad⁵⁵.

La definición de citotoxicidad generalmente depende de la clase del estudio, si las células tienen afectado su metabolismo o si mueren. Estos ensayos son empleados por ser baratos, también porque se pueden

cuantificar y reproducir. Muchos experimentos in vitro tienen la finalidad de determinar la potencial citotoxicidad de los compuestos estudiados ya que estos pueden ser usados como fármacos o cosméticos. Además, deben indicar que no son tóxicos para que puedan ser usados como anticancerígenos. La configuración de los modelos experimentales empleados in vitro para valorar la toxicidad de los compuestos químicos se fundamenta en dos pilares básicos, que son el sustrato biológico y los indicadores de toxicidad. El sustrato es el material generalmente orgánico sobre el que se aplica in vitro la sustancia de estudio. Estas alteraciones se valoran mediante indicadores de toxicidad, que son los parámetros que se determinan para cuantificar las modificaciones producidas en la estructura o fisiología de los componentes del sustrato de ensayo⁵⁶

1.7.1. Artemia en estudios de citotoxicidad

Artemia responde a un amplio rango de compuestos química y farmacológicamente diversos; es por ello que resulta tan importante su aplicación en programas de descubrimiento y desarrollo de nuevos plaguicidas y medicamentos de origen natural. Además, el ensayo permite la evaluación rápida de las relaciones estructura-actividad y son fácilmente observables las interacciones entre compuestos. El ensayo de letalidad de larvas de *A. salina* ha sido utilizado con eficiencia para detectar componentes con acción citotóxica (Solís et al ; 1993) y ha demostrado buena correlación al evaluar extractos de plantas con la toxicidad aguda oral en ratones. Estos hallazgos refuerzan la importancia de la utilización de este ensayo como prueba alternativa de toxicidad.

Con vistas a correlacionar la acción tóxica mostrada por extractos de plantas con otras actividades biológicas o con la presencia de determinados componentes químicos, varios autores reportan una clasificación de la toxicidad según el valor de la CL₅₀ del extracto. Aunque estas clasificaciones poseen variaciones entre sí, todas coinciden en agrupar los extractos con CL₅₀ inferiores a 100 µg/mL en las categorías de mayor toxicidad, mientras, los que muestran valores superiores a 1 000 µg/mL se clasifican como no tóxicos. (Iagarto, et al; 2001)

1.7.2. *Artemia*: Aspectos biológicos generales

Artemia spp. son camarones minúsculos de cuerpo blando, de color carmelita y transparentes a la luz; pertenecen al Phylum Arthropoda, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda. Se conocen comúnmente por el nombre de artemia, también llamados "monos de mar" o "brine shrimp" en inglés. El género *Artemia* está compuesto por varias especies, de las cuales se han identificado al menos cinco especies bisexuales y varias poblaciones partenogenéticas, entre ellas *Artemia salina* Leach, *Artemia persimilis* Piccinelli y Prosdocimi, *Artemia franciscana* Kellogg (bisexuales) y *Artemia partenogenetica*.

Estas especies se encuentran distribuidas en todo el mundo en aguas de elevada salinidad, pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35°C. Se alimentan de algas y bacterias y son fuente de alimento para peces, pájaros y varios invertebrados. Las hembras producen huevos que, en condiciones externas favorables, eclosionan produciendo larvas de un tamaño aproximado de 1 mm. Los huevos también pueden formar quistes y permanecer en esta forma por un año o más. Las artemias se convierten en adultos transcurridas 6 a 8 semanas, alcanzando un tamaño promedio de 7mm (Figura 2).



Figura 1: Huevos



Figura 2: Rotura de la membrana



Figura 3: Estadío de gota
(Membrana de eclosión
Unida al corión).



Figura 4: Nauplio



Figura 5: Metanauplio (24h).



Figura 6: Metanauplio (48h).

Figura 2. Diferentes estadíos del ciclo de vida de *Artemia franciscana* en estereomicroscopio.

En general las especies pertenecientes al orden anostraca poseen un cuerpo dividido en cabeza, tórax y abdomen, con apéndices torácicos no especializados y semejantes entre sí, mientras que el abdomen carece de los mismos. Los dos segmentos posteriores del tórax corresponden a la zona genital, mientras que el abdomen corresponde a seis segmentos posteriores a esta y concluye con el telson, el cual a su vez lleva un par de furcas caudales en su fin.

En la cabeza de los adultos pueden observarse un par de ojos compuestos y uno simple, los nauplios por su parte constan de un ojo medial

hacia el final anterior denominado ojo naupliar. El apéndice del primer segmento de la cabeza es el primer par de antenas, las cuales no son articuladas y presentan quimio-sensores. Seguidamente pueden observarse un segundo par de antenas de mayor tamaño que las primeras, estas presentan dimorfismo sexual en adultos y actúan como aparato de locomoción en los primeros estadios larvarios

Artemia es hasta la fecha el único género animal en todo el mundo cuyo estado criptobiótico (quistes) está disponible comercialmente de manera continua, como fuente de alimentos para peces y crustáceos en acuicultura. Esto ha constituido un elemento clave en su utilización en ensayos biológicos (12). Por razones prácticas, las especies con un estado criptobiótico, durante su ciclo de vida son más adecuadas para el desarrollo de un bioensayo estándar. La disponibilidad permanente de huevos (quistes) a partir de los cuales pueden ser obtenidas las larvas ofrece las siguientes ventajas:

- no hay necesidad de mantener una colonia viva permanentemente,
- las pruebas pueden realizarse dónde y cuándo sea necesario,
- se dispone siempre de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica.

En países como México, poseedores de una alta biodiversidad, resulta especialmente importante el estudio de las plantas, extractos o sustancias puras que presentan significativa actividad terapéutica. Dentro de las múltiples estrategias que se pueden utilizar para la selección de especies vegetales como fuentes de principios activos; el estudio de la letalidad que producen los extractos sobre larvas de *Artemia salina*, ha demostrado ser útil para tales propósitos (MEYER et al., 1982; LEWAN et al., 1992). Desde 1982 se han venido desarrollando bioensayos para la determinación de la toxicidad con la utilización de “camarones de mar” (*Artemia salina*); los cuales son utilizados como vía inicial de tamizaje tóxico de extractos, fracciones y compuestos depurados para discriminar aquellas muestras de elevada toxicidad, debido a que presenta buena correlación con la toxicidad in vitro, demostrando ser un

método adecuado para poner de manifiesto metabolitos secundarios relacionados con actividades biológicas interesantes (SANABRIA et al., 1997).

1.8. El endotelio vascular

1.8.1. Función del endotelio vascular

Hasta hace poco tiempo, el endotelio que recubre internamente los vasos sanguíneos era visto como una capa de células que sólo cumplía labores de revestimiento. En los últimos veinte años, la investigación ha revelado que posee una extraordinaria variedad de funciones, sobre el control del tono arterial, la coagulación, la fibrinólisis, y el crecimiento vascular. Recientemente, la alteración de dichas funciones o "disfunción endotelial" ha sido implicada como un evento clave en la patogenia de la aterosclerosis, la vasoconstricción coronaria y la isquemia miocárdica. La demostración que esta condición puede ser reversible abre la posibilidad de retardar la progresión de la aterosclerosis, reduciendo el riesgo de eventos cardiovasculares. Esto es importante dado la alta prevalencia de aterosclerosis, que la convierte en principal causa de muerte en los países desarrollados (Iribarra P et al., 2000).

1.8.2. Fisiología del endotelio vascular

Considerado como una barrera inerte de difusión entre la sangre y el músculo liso vascular, el endotelio es ahora reconocido como un órgano vital endocrino y paracrino que juega un papel clave en la prevención de la aterosclerosis. Entre las funciones importantes del endotelio están el mantenimiento del tono vascular, la regulación del crecimiento celular vascular, regulación de la adhesión leucocitaria y plaquetaria, regulación de la trombosis y fibrinólisis y mediación de la inflamación (Figura 3).

El endotelio normal detecta cambios en distintos factores hemodinámicos (p.ej. presión y fuerzas de rozamiento) y hormonales (p.ej. sustancias vasoactivas, así como mediadores que se producen en las células sanguíneas y plaquetas), y entonces sintetiza y libera sustancias biológicamente activas que mantienen la homeostasis vascular. El tono

vascular está regulado por la producción y liberación de varios factores dilatadores y constrictores. El factor vasodilatador endógeno más importante es el óxido nítrico (NO). El NO se genera por la conversión del aminoácido L-arginina en NO por la isoforma de la enzima endotelial NO sintetasa (eNOS, por sus siglas en inglés). El NO activa la guanil ciclasa en el músculo liso vascular, produciendo un incremento de concentraciones de GMPc. El GMPc, en cambio, activa la proteinquinasa dependiente de la cGMP, que disminuye las concentraciones de calcio citosólico, causando la relajación del músculo liso y disminuyendo el tono vascular.

Además de su importancia como vasodilatador, el NO influye en muchos de los efectos vasoprotectores del endotelio normal. La mayoría de los índices *in vivo* de la función endotelial evalúan la capacidad vasodilatadora de los vasos sanguíneos, pero reducen la reactividad vascular y probablemente, la disfunción endotelial, también refleja una defensa alterada contra el daño vascular, la inflamación y la trombosis (Badimón and Martínez-González, 2006).

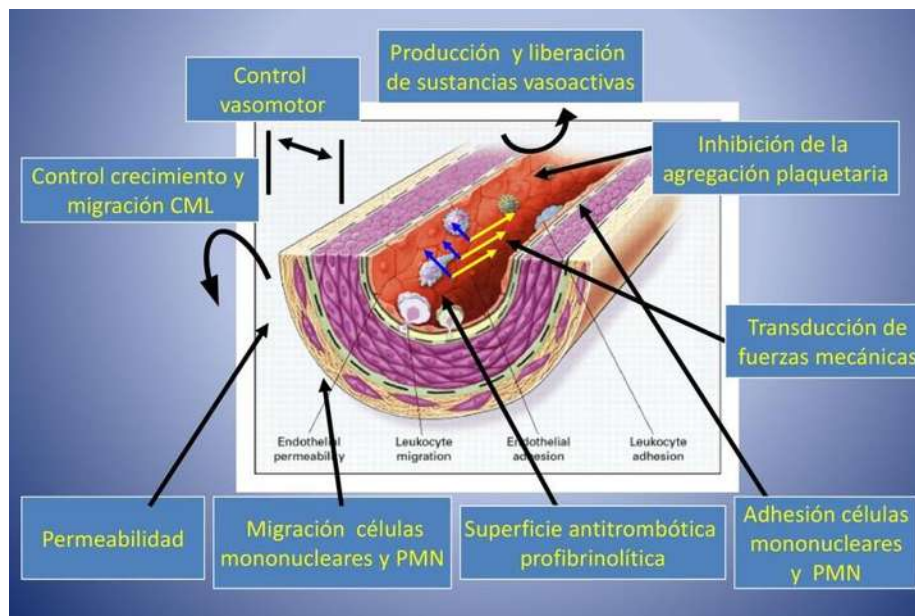


Figura 3. Funciones del endotelio vascular (Nexar-QH & Sillo-Surco, 2013).

1.8.3. Acción del Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) se genera en diferentes tipos de células por al menos tres isoformas del óxido nítrico sintasa (NOS). La NOS neuronal (nNOS) y la NOS endotelial (eNOS) se expresan de forma constitutiva y su actividad enzimática es dependiente de Ca^{2+} / calmodulina. La tercera enzima es un inducible y Ca^{2+} - isoforma independiente de NOS (iNOS) que se expresa en prácticamente todos los tipos de células después de la estimulación con LPS y / o con diferentes citoquinas, como el interferón-gamma (IFN- γ), interleucina-1-beta (IL-1 β), o factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Las cantidades masivas de NO producidas por iNOS bajo condiciones patológicas (por ejemplo, inflamación aguda y crónica) son potencialmente dañinas, especialmente cuando la regulación espacial-temporal de la expresión de iNOS se ve comprometida. Durante la inflamación asociada con diferentes patógenos, la producción de NO aumenta significativamente y puede volverse citotóxica. Además, la sobreproducción de NO también se ha relacionado con la enfermedad inflamatoria de la piel. Además, la naturaleza de radicales libres de NO y su alta reactividad con el oxígeno para producir peroxinitrito (ONOO-) hace de NO una potente molécula prooxidante capaz de inducir daño oxidativo y daño potencial hacia objetivos celulares. Por lo tanto, la inhibición de la producción de NO en respuesta a estímulos inflamatorios podría ser una estrategia terapéutica útil en las enfermedades inflamatorias (Youn et al., 2017).

Los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno son generadas por químicos exógenos o procesos metabólicos endógenos en los sistemas alimentarios o el cuerpo humano. Estos radicales pueden causar daño oxidativo que resulta en muerte celular y daño tisular al oxidar las biomoléculas. El daño oxidativo juega un papel patológico significativo en la enfermedad humana. Como ejemplos, la aterosclerosis, el cáncer, el enfisema, la cirrosis y la artritis se han relacionado con el daño oxidativo. Por lo tanto, la ingestión de suplementos antioxidantes o alimentos que contienen antioxidantes puede ser una forma importante de reducir el daño oxidativo (Youn et al., 2017). Recientemente, se han introducido en los

alimentos antioxidantes naturales, como las vitaminas C y E, el sesamol y el ácido carnósico, en respuesta a la demanda de los consumidores. Actualmente, se exploró la actividad antioxidante de los compuestos de *Quercus* evaluando su radical DPPH y sus actividades de eliminación de superóxido NBT (Youn et al., 2017).

1.8.4. Fisiopatología del endotelio y Disfunción endotelial

El endotelio es un tejido funcionalmente complejo, productor de múltiples agentes que actúan en forma endocrina, paracrina y autocrina que afectan la vasoregulación, proliferación de células del músculo liso vascular, agregación plaquetaria y adhesión de monocitos. La vasoregulación ocurre como resultado de un equilibrio entre la liberación de factores relajadores y constrictores. El factor relajador predominante es NO, sintetizado desde L-arginina a través del sistema de enzimas conocido como óxido nítrico sintasas (NOS) que convierte L-arginina y oxígeno en NO y L-citrulina. Se distinguen tres isoformas de NOS, dos de ellas constitutivas, que se expresan en diferentes tejidos en condiciones fisiológicas o patológicas y son dependientes de calcio, la endotelial (eNOS) y la neural (nNOS); la isoforma inducible (iNOS) está presente en macrófagos y células inflamatorias. Fisiológicamente, la isoforma inducible se expresa en muy bajas concentraciones y su transcripción puede ser inducida por citokinas como interleukina-1, factor de necrosis tumoral y factores de crecimiento (Irribarra P et al., 2000).

1.8.5. Vasodilatación producida por Óxido Nítrico

Los estímulos que activan la eNOS incluyen trombina, ADP, bradicinina, sustancia P, agonistas muscarínicos, roce tangencial y corriente circular. El aumento de actividad de eNOS producto del roce tangencial de la sangre contra la capa endotelial (*shear stress*), contribuye a la vasodilatación mediada por flujo, un importante mecanismo de autorregulación por el cual aumenta el flujo sanguíneo en respuesta al ejercicio. Una vez producido, el NO difunde desde la célula endotelial al músculo liso subyacente, en el que activa el sistema enzimático de guanilato ciclasa soluble, que al unirse a NO aumenta la concentración de GMPc, responsable final de los efectos celulares

inducidos por NO. El GMPc genera disminución en la concentración de calcio intracelular, a través de activación de proteínas kinasas sensibles a GMPc que fosforilan proteínas claves como canales iónicos, bombas y enzimas que llevan a la relajación del músculo liso subyacente. De este modo la vía NO-GMPc es la mediadora de los efectos relajadores de muchas hormonas, incluyendo histamina, nitro-vasodilatadores, acetilcolina, estrógenos, isoproterenol e insulina. Existen otros factores de relajación que incluyen a prostaciclina y al factor hiperpolarizante (cuya estructura es desconocida), que son antagonizados por factores constrictores también liberados por el endotelio tales como endotelina-1, tromboxano, y prostaglandina H₂ (Irribarra P et al., 2000).

1.8.6. Otras funciones del óxido nítrico

Además de su rol vasodilatador, el NO (entre otras funciones) es un inhibidor de crecimiento y migración celular, de la expresión de moléculas proinflamatorias y de adhesión. Por este motivo, el endotelio normal tiene funciones anti-trombóticas y anti-ateroescleróticas, inhibe la agregación plaquetaria, la adhesión de monocitos y la proliferación del músculo liso vascular, todos factores de importancia en el desarrollo de aterosclerosis y disrupción de la placa aterosclerótica. Por el contrario, en el endotelio disfuncional se induce la síntesis de moléculas quimotácticas y de adhesin para monocitos y linfocitos T y de factores que inducen diferenciación de monocitos a macrófagos. El endotelio disfuncional promueve la agregación plaquetaria a través de una menor disponibilidad de óxido nítrico y favorece la trombosis a través de una alteración de la relación entre activador del plasminógeno versus su inhibidor endógeno. Estudios in vitro han evidenciado que las células endoteliales provenientes de un endotelio disfuncional, presentan un estado protrombótico caracterizado por un aumento de la actividad de factor tisular y disminución de la actividad de proteína C (Irribarra P et al., 2000).

1.9. Mecanismos de relajación

1.9.1. Óxido nítrico y su mecanismo de relajación

Furchgott y Zagadski descubrieron en 1980 el papel fundamental del endotelio como regulador de la vasodilatación, al describir el fenómeno de la relajación del músculo liso vascular dependiente de endotelio. Ellos demostraron que anillos arteriales previamente contraídos se podían relajar en respuesta a la acetilcolina sólo si las células endoteliales estaban intactas. Eliminando el endotelio anulaban la vasodilatación producida por la acetilcolina, lo cual sugería que su efecto estaba mediado por alguna sustancia derivada de endotelio que se denominó EDRF (factor relajante derivado de endotelio). Posteriormente, se demostró que el EDRF era el NO (Vittone y Mundiña- Weilenmann, 2010).

El NO es lipofílico y se forma a parte del grupo guanidina del aminoácido semiesencial L- arginina en su conversión a L- citrulina, gracias a la acción de la enzima NO sintetasa (NOS); para su síntesis se requiere la presencia de cofactores como: flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (BH₄) y NADPH. Se han identificado tres isoformas de NOS: la endotelial (NOS_e) y la neuronal (NOS_n) que son constitutivas y una inducible (NOS_i). Las enzimas se codifican a partir de los cromosomas 7, 12, y 17, respectivamente. Las formas constitutivas forman parte de las células y su expresión es dependiente de calcio, en tanto que la forma inducible es expresada principalmente en condiciones de inflamación o infección y es independiente de este catión. La enzima endotelial está ubicada en la membrana celular y en algunas ocasiones en el citoplasma, mientras que la NOS_n es fundamentalmente citosólica (Benavides y Pinzón, 2008).

A nivel intracelular, el NO activa el guanilato ciclasa soluble (sGC) y produce un cambio conformacional en el sitio catalítico, lo cual permite la conversión de guanosina-5-trifosfato a guanosina-3,5-monofosfato cíclica (GMPc) (Figura 4), esta acción incrementa la concentración de GMPc celular hasta 100 veces y reduce la cantidad de calcio intracelular, permitiendo la

relajación muscular mediada por la proteína cinasa dependiente de GMPc (Benavides y Pinzón, 2008).

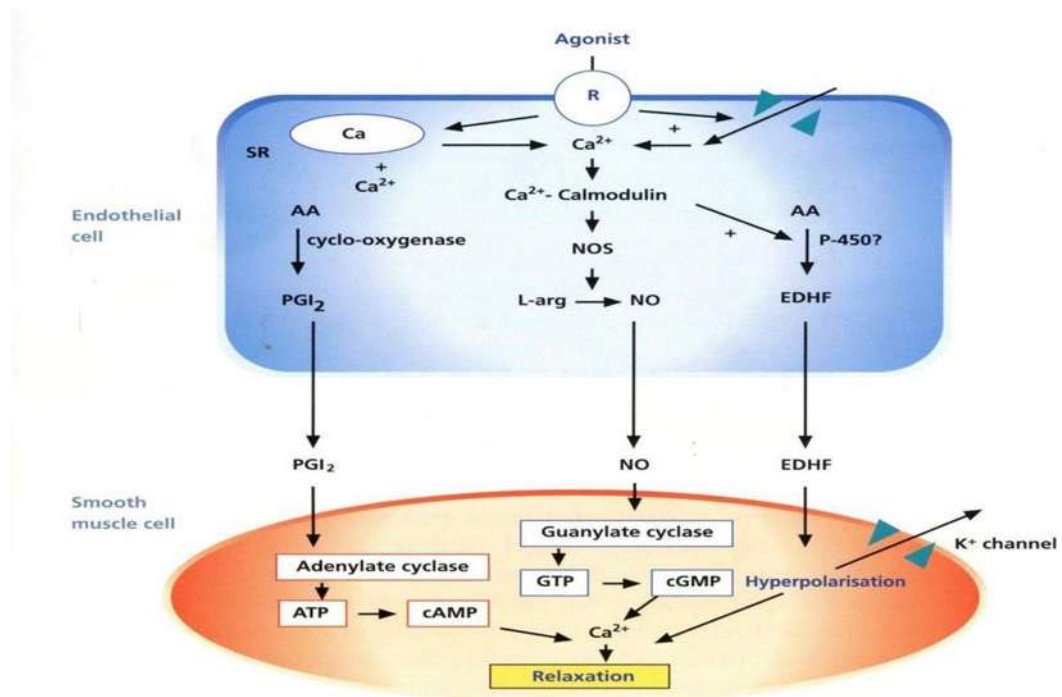


Figura 4. Mecanismos de relajación de la función endotelial

La activación de la sGC por la unión del NO a su grupo hemo origina diferentes respuestas en las células dianas o efectoras: vasodilatación, inhibición plaquetaria y aumento del GMPc (Leiva y col., 2000). En el músculo liso vascular, los efectos del GMPc son mediados a través de proteínas cinasas y canales iónicos. El GMPc hiperpolariza la membrana celular, inhibiendo el flujo de calcio y disminuyendo la sensibilidad de los miofilamentos al mismo (Benavides y Pinzón, 2008).

El efecto vasodilatador de esta molécula es estimulado por diferentes factores entre los que se encuentra: la hipoxia, el flujo sanguíneo, la tensión de estiramiento, la histamina, la bradiquinina, la trombina, los ácidos grasos insaturados y a PGI₂; es inhibido a su vez por las endotelinas. Se han identificado además inhibidores de la síntesis de NO entre los cuales se destacan: la hemoglobina, el azul de metileno y la N-monometil-L-arginina (L-NMMA) (Leiva y col., 2000).

1.9.2. Prostaciclina y su mecanismo de relajación

Los prostanoideos son una familia de mediadores lipídico-bioactivos, formados por la ciclooxigenasa (COX) a partir del ácido araquidónico (AA), contenido en la membrana celular de todas las células del cuerpo. Están involucrados en numerosas actividades fisiológicas, incluyendo la agregación plaquetaria, la vasodilatación y la vasoconstricción, la respuesta inflamatoria local y la adhesión celular de leucocitos al endotelio (Morita, 2002; Hinz, 2002).

Recientemente, varios tipos de receptores para PGE₂, PGF_{2a}, PGI₂, PGD₂, y tromboxano A₂ han sido caracterizados usando enfoques farmacológicos y bioquímicos. Los receptores de prostaglandinas son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G que parece contar con una estructura única que consta de siete segmentos transmembranales (Kimura y col., 2009).

La prostaciclina (PGI₂) es el prostanoide más abundante generado por las paredes vasculares y es producido por las células endoteliales a partir del ácido araquidónico, derivado de la prostaglandina H₂, a través de la acción de la enzima COX-PGI₂ sintetasa. La PGI₂ es descrita como un vasodilatador derivado de endotelio que, por estimulación del receptor PGI₂ (receptor IP) y la activación del adenilato ciclasa (AC), induce un incremento en la concentración intracelular de AMPc a partir de ATP, provocando la activación de una proteína quinasa específica llamada proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), de manera que produce hiperpolarización, la cual es causada por la abertura de uno o más tipos de canales de potasio. Por lo tanto, la relajación inducida por PGI₂ puede estar asociada con k-ATP, BK Ca y canales de potasio rectificadores de entrada (Feletou y Vanhoutte, 2006).

Los principales factores capaces de estimular la síntesis y la liberación de PGI₂ son la angiotensina II, la acetilcolina (ACh) o la bradiquinina (BK), así como productos liberados de las plaquetas como la serotonina y el factor de crecimiento liberado de plaquetas (Navarro-Cid y col., 1999).

II. JUSTIFICACIÓN

La investigación dirigida a los productos herbolarios con fines terapéuticos ha recibido mucha atención por parte de la comunidad científica. México es el segundo centro de biodiversidad de encinos a nivel mundial, por lo que los encinos constituyen el segundo recurso forestal más importante de México. Su explotación forestal genera una gran cantidad de desechos en forma de cortezas, en particular *Quercus scytophylla*, que en Michoacán es una de las más abundantes, y estas cortezas pueden ser aprovechadas para el desarrollo de productos de alto valor agregado como son los medicamentos. Dada la alta concentración en sus extractos de polifenoles, moléculas reconocidas por presentar efectos benéficos a nivel cardiovascular, una aplicación que pudiera vislumbrarse es el uso de estos extractos como hipotensores, aunque para ello es necesario llevar aparejada una evaluación de los posibles efectos toxicológicos, siendo necesario recurrir a ensayos de laboratorio usando modelos de citotoxicidad. La *Artemia* es un modelo que permite valorar efectos citotóxicos siendo a la vez fácil de manipular con costos muy asequibles. Por otro lado, es necesario llevar a cabo una valoración farmacológica de los extractos utilizando modelos biológicos, ya que se tiene el conocimiento empírico de las propiedades hipotensoras de la corteza de encino, pero la evaluación del efecto constrictor o dilatador sobre un modelo *in vivo* no se ha demostrado. Los resultados de este estudio permitirán evidenciar la posible utilidad terapéutica de este extracto como hipotensor y comprobar los beneficios cardiovasculares a nivel endotelial que resultarían en un impacto benéfico de su consumo por parte de la población .

III. HIPÓTESIS

El extracto acuoso y etanólico de *Quercus scytophilla* puede presentar actividad citotóxica *in vitro* sobre *Artemia franciscana*.

La corteza de encino de *Quercus scytophilla* contiene compuestos activos que presentan actividad vasodilatadora sobre el músculo liso vascular, siendo un regulador de este efecto el endotelio vascular.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estimar el efecto citotóxico y el impacto toxicológico agudo a los extractos acuoso y etanólico de *Quercus scytophilla* (Encino) utilizando un bioindicador zooplanctónico (*Artemia franciscana*)

Identificar el efecto vasodilatador del músculo liso vascular con un extracto acuoso y etanólico de *Quercus scytophilla* sobre aorta de rata Wistar

4.2 Objetivos específicos

- ❖ Calcular la CL 50 y su NOEC a 24 horas del extracto acuoso de *Quercus scytophilla* sobre *A. franciscana*
- ❖ Calcular la CL50 y su NOEC a 24 horas del extracto etanólico de *Quercus scytophilla* sobre *A. franciscana*
- ❖ Estudiar el efecto citotóxico de los extractos acuoso y etanólico de *Quercus scytophilla* sobre *A. franciscana*
- ❖ Exponer a concentraciones crecientes del extracto acuoso de *Quercus scytophilla* los anillos de arteria aorta torácica con y sin endotelio para estudiar el efecto vasorrelajante
- ❖ Exponer a concentraciones crecientes del extracto etanólico de *Quercus scytophilla* los anillos de arteria aorta torácica con y sin endotelio para estudiar el efecto vasorrelajante

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Bioensayo con *Artemia franciscana*

5.1.1. Sustancia de Ensayo

Los compuestos utilizados fueron extractos acuoso y etanólico de la corteza del árbol *Quercus scytophilla*. En cada uno de los extractos etanólico y acuoso se realizaron diluciones seriadas en 1 mL (1000 µL) de agua tridestilada.

5.1.2. Agua marina sintética.

La preparación de agua marina se realizó a partir 35 g de sal marina de la Marca Sera PREMIUM, libre de nitratos, fosfatos y silicatos; la cual se disolvió en 1000 mL de agua tridestilada (J.T.BAKER) hasta alcanzar una concentración del 35% de salinidad y se ajustó a un pH entre un rango de 8-8.6.

Se realizó la dilución de cada uno de los compuestos en agua marina sintética para la obtención de las diferentes concentraciones exponenciales para el extracto de *Quercus scytophilla* etanólico, se trabajó con 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L; y para el extracto de *Quercus scytophilla* acuoso 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L.

5.1.3. Material Biológico

Los ensayos se realizaron con Nauplios de 24 h de *Artemia franciscana* obtenidos a partir de la hidratación de quistes (Argent Chemical Laboratories, Washington, USA) a 4 °C por 12 h, fueron incubados a 28 °C en agua marina sintética a 33-35% (33-35 g/L) de salinidad pH de 8.4±0.2 a 24 h y una intensidad de fotones de 18.520 µmol/m²s (1000 lux).

5.1.4. Determinación de la toxicidad aguda de los extractos etanólico y acuoso de cortezas de *Quercus scytophillia* sobre nauplios de *Artemia franciscana*.

La metodología para la determinación de las concentraciones letales 50% (LC50) es la propuesta por Persoone, et al. (1989) y modificada posteriormente por Sánchez-Fortún, et al. (1995), consiste en la determinación de la concentración que causa la muerte del 50% de nauplios de *Artemia franciscana* en 24 h sobre placas multipocillo de 24 pocillos (Sarstedt Inc., USA). Primero se pusieron en incubación los quistes de *A. franciscana* descrito en el diagrama 1., después en cada pocillo de las placas multiposillo se distribuyeron 10 nauplios de 24 h de *A. franciscana* los cuales fueron expuestos a las diferentes concentraciones del sulfato de cobre y cloruro férrico respectivamente en forma ascendente, obteniendo un volumen total de 1 mL (1000 µL). Para cada concentración del compuesto químico se estableció un control y cuatro repeticiones con un número de 12 ensayos, posteriormente se incubaron las placas a 28 °C por 24 h manteniéndolas en oscuridad y manteniendo humedad a temperatura media de 25 °C. Finalmente transcurridas las 24 h de exposición se determinó el número de nauplios muertos en cada pocillo, en la cual se realizó la lectura a través de un estereoscopio (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) contabilizando el número de nauplios vivos y muertos de *A. franciscana* en cada uno de los pocillos de cada concentración, considerándose muertos aquellos que no presentaron movilidad durante 10 seg observados en el estereoscopio.

5.2. Estudio de contracción en arterias aisladas.

Los animales se sacrificaron y se expusieron las arterias aorta torácica. Las arterias se disecaron y se limpiaron de tejido conectivo y graso. Las arterias aisladas se cortaron en anillos de 3-4 mm de longitud. A los anillos de aorta y de mesentérica se les removió el endotelio frotando suavemente la superficie interna de los vasos con un dispositivo metálico rugoso. Los anillos se introdujeron en cámaras para órgano aislado que contenían 10 ml de solución de Krebs-Henseleit con la siguiente composición (mM): NaCl, 118;

KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄ · 7H₂O, 1.2; CaCl₂ · 2H₂O, 2.5; NaHCO₃, 25.0; dextrosa, 11.7; EDTA, 0.026 (Ibarra et al., 2000).

Las cámaras para órgano aislado se mantuvieron a 37°C, pH 7.4 y con burbujeo constante con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂. Cada anillo arterial se montó en dos ganchos de nikrom; con uno de estos ganchos se fijó la preparación al fondo de la cámara y con el otro gancho se fijó a un transductor de tensión (Grass FT03 force displacement transducer; Astro-Med, Inc. West Warwick, RI, USA), que estaba conectado a un sistema de adquisición de datos (MP100; Biopac Systems Inc. Santa Barbara, CA, USA), para registrar cambios en la tensión isométrica desarrollados por los anillos arteriales.

Los anillos se sometieron a una tensión inicial de 3 g y se sensibilizaron 3 veces, a intervalos de 30 minutos, con una concentración submáxima de fenilefrina (3.1x10⁻⁸ M) y se construyeron curvas concentración-respuesta a la fenilefrina (1x10⁻⁹-3.1x10⁻⁵ M). Después de la primera curva a la fenilefrina (curva control) se realizaron curvas concentración-respuesta en presencia de concentraciones crecientes de los extractos etanólico y acuoso de (10mcg/mL, 100mcg/mL, 1mg/mL, 10mg/mL, 100mg/mL); 30 minutos antes y durante la curva al agonista.

5.3. Análisis estadístico

Los valores de las LC₅₀ 24 h y NOEC sobre *A. franciscana* fueron obtenidos por medio de regresión lineal a través de una relación de Concentración-Respuesta calculando los logaritmos de las concentraciones finales, relacionados con el porcentaje de mortalidad (% mortalidad vs Log Concentración). Se utilizó el Teorema de Tchebysheff para expresar la respuesta de Mortalidad de cada concentración, el cual se basa en:

$$\mu \pm k \sigma$$

Donde: μ = Media

k = es una constante que puede tomar cualquier valor mayor a 1 (en este caso se trabajó con un valor de 2, que fue tomado de acuerdo con la regla

empírica para Distribución normal la cual nos dice que aproximadamente el 95% de los valores caerán dentro de dos desviaciones estándar con respecto a la media de cada una de las concentraciones).

σ = Desviación estándar .

Se utilizó el modelo de Regresión Lineal la obtención de las LC50 y el ajuste de las curvas fue por medio del Método de Mínimos Cuadrados. La prueba de distribución normal de los datos se realiza a través de la prueba D'Agostino y Pearson. Para determinar las diferencias estadísticas entre cada valor de LC50 24 h fue realizado a través de la comparación múltiple por t-student utilizando un intervalo de confianza de $p < 0.05$ (95%). Los cálculos estadísticos son realizados por el paquete estadístico Graphpad Prism v7.0 (Graph-Pad Software Inc., USA). La determinación del efecto de las combinaciones de los productos químicos se realizó a través de un sistema de algoritmos basados en el Índice de Combinación de Chou & Talalay (1984) y su respectivo gráfico Fa-IC (Respuesta Índice de Combinación), mediante el programa informático CompuSyn v 1.0 desarrollado por (Chou & Martin, 2005, 2010).

VI. RESULTADOS

6.1. Resultados de Bioensayo de toxicidad aguda en *Artemia franciscana*

Se determinó la toxicidad aguda a 24 h de exposición de los extractos acuoso y etanólico de *Quercus scytophylla* sobre nauplios de *A. franciscana* por medio de la determinación de la respuesta LC₅₀ de cada compuesto ensayado tanto en su forma individual y comparando sus resultados.

Para el extracto acuoso de *Quercus scytophylla* se observó una toxicidad leve en bajas concentraciones con respecto a su respuesta de concentración letal 50 a 24 h de 1.71 g/L, mientras que para el extracto etanólico *Quercus scytophylla* fue de 2.39 g/L siendo más elevada la concentración para provocar la muerte del 50% de la población evaluada presentando una toxicidad a corto plazo relativamente baja por encima de 1 g/L; en la Tabla 3 se muestran los valores de la 24 h-NOEC, la LC₁₀ y LC₉₀ a 24 h de cada compuesto respectivamente con sus límites de confianza del 95%. La Figura 5 muestra la relación concentración/respuesta de ambos extractos.

Conforme a la clasificación propuesta por la EPA (Agencia de Protección Ambiental) para categorizar a las sustancias o contaminantes en ambientes acuáticos en cuanto a su toxicidad aguda (LC₅₀ mg/L), se encuentra que en la categoría o clase I se clasifican las sustancias con una LC₅₀ ≤ 1 mg/L, es decir, en sustancias altamente tóxicas para organismos acuáticos, en la categoría II se encuentran las sustancias con una LC₅₀ >1 - ≤ 10 mg/L siendo sustancias tóxicas para organismos acuáticos, en la categoría III con una LC₅₀ >10 - ≤ 100 mg/L se localizan las sustancias peligrosas para el ambiente acuático y en la categoría IV con una LC₅₀ > 100 mg/L encontraríamos a las sustancias no nocivas para los organismos acuáticos (Cortés, 2012; Sánchez-Fortún R. & Barahona, 2002). Por consiguiente, el extracto acuoso como etanólico de *Quercus scytophylla* expuesto a nauplios de *A. franciscana* puede clasificarse dentro de la categoría IV, es decir, en sustancias no nocivas para el ambiente acuático (véase tabla 4). Aunque estas clasificaciones poseen variaciones

entre sí, todas coinciden en agrupar los extractos con CL50 inferiores a 100 µg/mL en las categorías de mayor toxicidad, mientras, los que muestran valores superiores a 1 000 µg/mL se clasifican como no tóxicos.

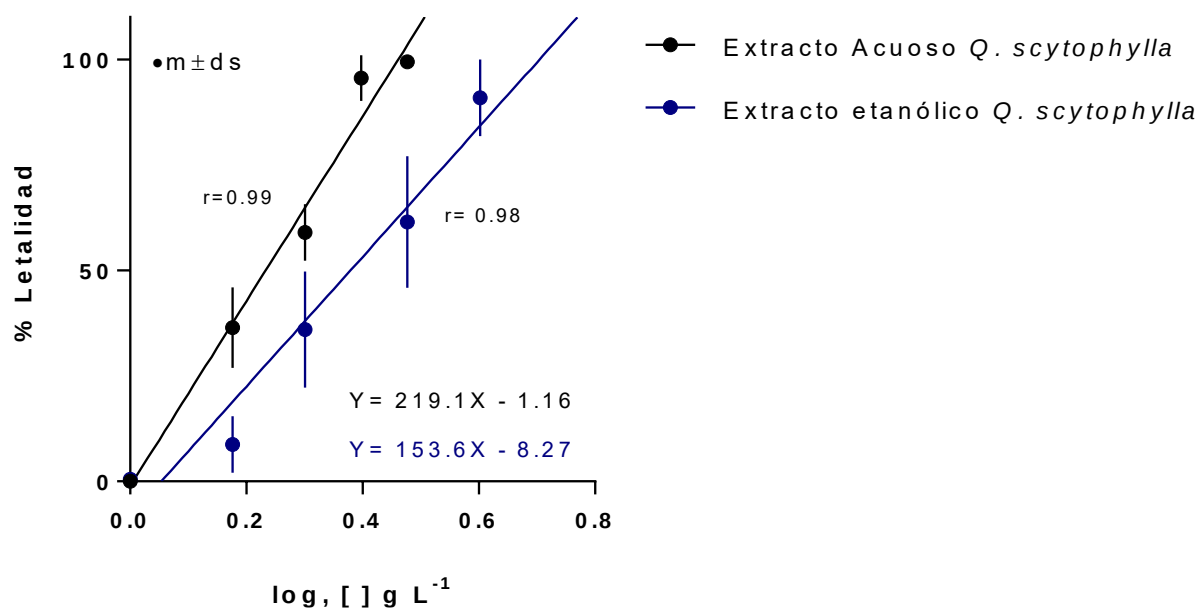


Figura 5. Relación Concentración Respuesta lineal de los extractos acuoso y etanólico de *Quercus scytophylla* sobre nauplios de 24 h de *Artemia franciscana*. Cada punto (•) representa la media $\pm$ su desviación estándar ($\mu \pm \sigma$)

Tabla 3. Valores obtenidos de CL50 y NOEC, 24hrs después de la exposición del extracto etanólico y acuoso de *Quercus scytophylla* sobre nauplios de *Artemia franciscana*

Extracto Acuoso	Extracto Etanólico
24h NOEC: 1.01 g/L	24h NOEC: 1.13 g/L

$CL_{50(24)}: 1.71 \text{ g/L}$	$CL_{50(24)}: 2.39 \text{ g/L}$
---------------------------------	---------------------------------

Tabla 4. Clasificación de toxicidad aguda en ambientes acuáticos marinos de acuerdo con la EPA.

TOXICIDAD AGUDA ($CL_{50} \text{ mg L}^{-1}$)	CATEGORÍA
≤ 1	CATEGORIA I: Sustancias muy tóxicas para el ambiente acuático
1-10	CATEGORIA II: Sustancias tóxicas para el ambiente acuático
10-100	CATEGORIA III: Sustancias peligrosas para el ambiente acuático
≥ 100	CATEGORIA IV: Se consideran no tóxicas

6.2. Resultados del extracto etanólico y acuoso en Arteria aorta.

En el presente estudio se logró observar que la respuesta obtenida en los ensayos es diferente y altamente dependiente del extracto probado (ya sea etanólico o acuoso), existiendo una diferencia debida a la presencia del endotelio, lo cual se evidencia con la ausencia del endotelio ya que se percibe un aumento en la respuesta contráctil del músculo liso vascular de la arteria aorta torácica, sin embargo, al aplicar el extracto etanólico en la concentración más elevada se llega a producir un efecto vasodilatador.

En la respuesta observada en el extracto etanólico, con y sin endotelio, se observó una gran diferencia en la magnitud de la respuesta obtenida, a partir de las concentraciones más bajas, resultando en una mayor constricción cuando no hay endotelio; sin embargo, en la concentración más elevada se obtiene una respuesta vasorrelajante (Figura 6).

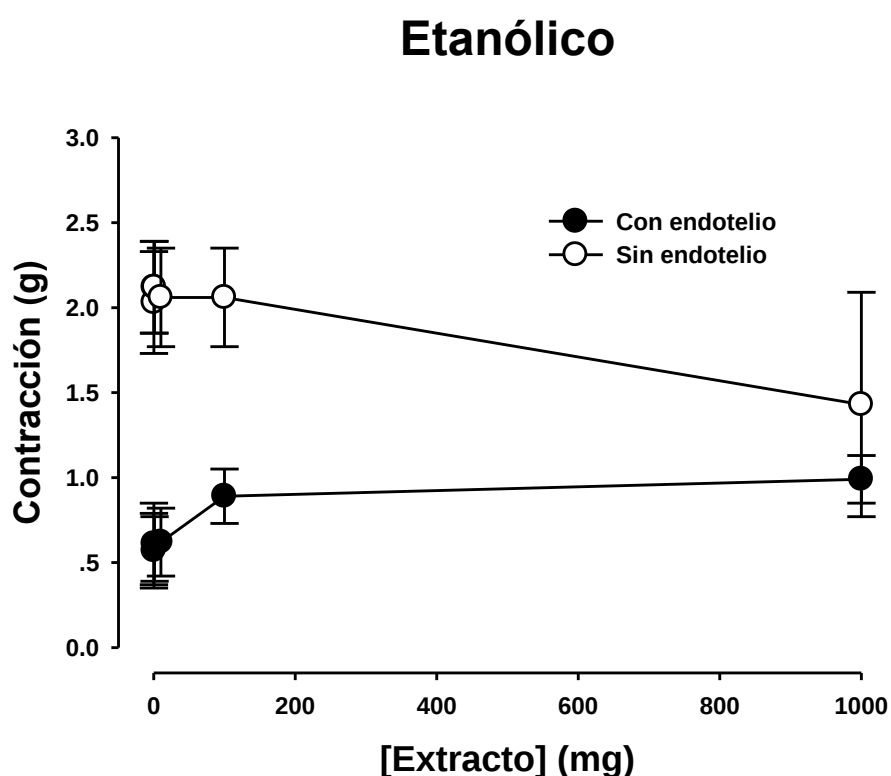


Figura 6. Contracción arterial en presencia del extracto etanólico de *Quercus scytophylla*

En cuanto a la respuesta al extracto acuoso es totalmente dependiente de la presencia del endotelio. Las diferentes concentraciones a las que se expuso la aorta dan una respuesta similar, pero con magnitud diferente, siendo la constricción de la arteria hasta tres veces mayor comparada con la que se produce en ausencia de endotelio. En este caso, a la concentración más elevada (100 mg/L), no se observa el efecto vasorrelajante que ocurría con el extracto etanólico (Figura 7).

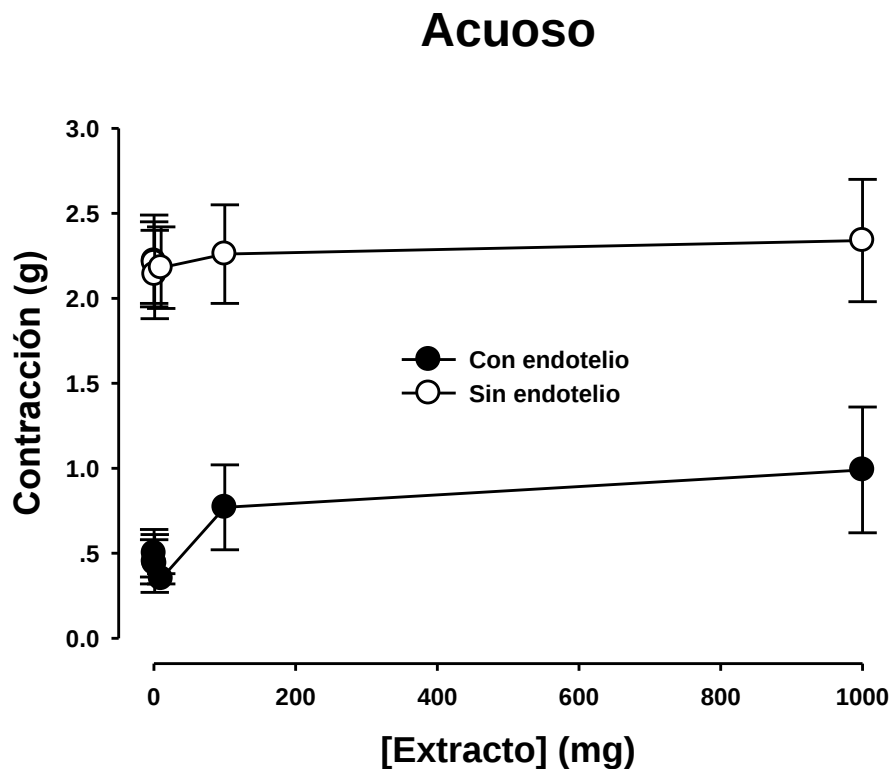


Figura 7. Contracción arterial en presencia del extracto acuoso de *Quercus scytophylla*.

VII. DISCUSIÓN

La detección de extractos de plantas medicinales con acción hipotensora es el propósito final de muchas investigaciones. Sin embargo, la fuerte acción citotóxica de un extracto vegetal o la demostración de toxicidad *in vivo* constituyen limitaciones relevantes para su uso en la práctica clínica.

El ensayo de letalidad de larvas de *A. franciscana* ha sido utilizado con eficiencia para detectar componentes con acción citotóxica y ha demostrado buena correlación al evaluar extractos de plantas con relación al ensayo de toxicidad aguda oral en ratones. Estos hallazgos refuerzan la importancia de la utilización de este ensayo como prueba alternativa de toxicidad. En 1982, Meyer et al., fueron los primeros en introducir el uso de las larvas de *Artemia* spp. en sustitución de animales superiores en la evaluación de extractos vegetales para el descubrimiento de compuestos con actividad antitumoral y citotóxica (Martínez-Ramírez and Contreras-Esquivel, 2010). Este ensayo se utiliza para la pre-evaluación de extractos vegetales en el descubrimiento de compuestos antitumorales. Inicialmente, se determinó que existe una correlación positiva entre la mortalidad de las larvas de *Artemia* y la citotoxicidad frente a las células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y la línea celular 3PS(P388) de leucemia. En general, los valores de ED₅₀ para las citotoxicidades son aproximadamente una décima parte de los valores de LC₅₀ encontrados en los ensayos con *Artemia* spp.

El ensayo de *Artemia* ha sido utilizado para la evaluación inicial de seis líneas celulares de tumores humanos. De este modo, es posible detectar y entonces monitorear el fraccionamiento de extractos con actividad citotóxica, utilizando el ensayo de mortalidad de larvas más que otros ensayos antitumorales *in vivo* o *in vitro* que resultan más tediosos y costosos. De este modo, se han descubierto hasta el momento más de 300 compuestos antitumorales y plaguicidas utilizando este bioensayo en la preevaluación (Irribarra P et al., 2000)

En el presente trabajo se investigaron las propiedades toxicológicas de un extracto acuoso y etanólico de *Q. scytophylla* utilizando un modelo biológico con el bioindicador *Artemia franciscana*. Los resultados obtenidos de la concentración letal media en *Artemia franciscana* muestran una baja toxicidad del extracto acuoso de *Q. scytophylla* sobre este crustáceo ($>1000 \mu\text{g/mL}$) con intervalos cercanos entre la NOEC y LOEC. Es así que, de acuerdo con los parámetros establecidos por la Agencia de Protección Ambiental (EPA), el extracto acuoso de cortezas de *Q. scytophylla* no es tóxico a corto plazo en representantes zooplanctónicos de agua marina ya que de la CL_{50} obtenido es mayor a 100mg/L (Categoría IV según la EPA) (Tabla 4).

El ensayo de letalidad realizado en *Artemia sp*, aunque no es un método aceptado aún por las entidades regulatorias en materia de medicamentos, ha demostrado ser efectivo para analizar la toxicidad de extractos derivados de plantas. Se trata de un método atractivo porque es muy simple, económico y requiere concentraciones pequeñas de extractos. Comparando los resultados obtenidos con los reportados por Tawaha en 2005 (Alali et al., 2005), quien utilizó dicho método para determinar la toxicidad de numerosos extractos naturales y estableció que los extractos de plantas con una $CL_{50} > 1000\mu\text{g/ml}$ en *Artemia sp* presentan baja toxicidad podría considerarse que el extracto de *Q. scytophylla* presenta una pobre toxicidad sobre este crustáceo. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran algunos aspectos que deben ser analizados como la cercanía entre los valores de la NOEC, la LOEC y la CL_{10} , lo que indica que el margen de seguridad del extracto acuoso de *Q. scytophylla* es relativamente estrecho, debiendo ser utilizado con cuidado por parte de la población.

En definitiva, los resultados del presente trabajo son favorables ante el hecho de que los extractos evaluados mostraron, mayoritariamente, baja toxicidad en este modelo. Sin embargo, cabe destacar que se observó una ligera diferencia entre los efectos del extracto acuoso y el extracto etanólico, al observar una mayor toxicidad producida por el extracto acuoso lo que sugiere una responsabilidad posiblemente proveniente de la solubilidad (Durán and Alvarez, 2000) o bien de la composición relativa de ambos extractos. Valencia y colaboradores evaluaron la concentración de fenoles

totales, ácidos hidroxicámicos, proantocianidinas y flavonoides en el extracto acuoso y etanólico de cortezas de *Quercus scytophylla*, observando que el extracto acuoso era significativamente más concentrado en flavonoides (Valencia-Avilés et al., 2018). Aunque, en lo mejor de nuestro conocimiento, no se ha realizado una caracterización química exhaustiva de los extractos de esta especie otros estudios sugieren que flavonoides como la santoflavona pueden ser tóxicos sobre *Artemia* sp. (S et al., 2009). Otras investigaciones deben realizarse para elucidar la composición química de ambos extractos y tratar de establecer las moléculas responsables del efecto tóxico observado.

La valoración de los extractos acuoso y etanólico de *Quercus scytophylla*, en lo que concierne al estudio del efecto vasodilatador en arterias aisladas de ratas *Wistar* mostró resultados disímiles. A bajas concentraciones puede observarse una respuesta constrictora leve, siendo sin embargo sobresaliente la diferencia en la magnitud de la respuesta cuando el endotelio de la pared vascular está ausente, este efecto permite observar que el endotelio vascular es un modulador de la contracción vascular sobre el músculo liso, lo que tendría efectos notables sobre la fisiología vascular en diferentes padecimientos como la hipertensión arterial. Dentro de este estudio la exposición al extracto etanólico, en la condición sin endotelio, en comparación con el extracto acuoso da como resultado una vasodilatación, lo cual sugiere que los compuestos vasoactivos contenidos en el extracto etanólico tienen una mayor bioactividad responsable de este efecto farmacológico. Si se analiza el estudio anterior de Valencia y colaboradores (Valencia-Avilés et al., 2018), puede constatar que el extracto etanólico de cortezas de *Q. scytophylla* presenta concentraciones significativamente más importantes en fenoles totales (521 vs. 329 mg GAE/g), ácidos hidroxicámicos (173 vs. 113 mg ChAE/g) y proantocianidinas (48.4 vs. 12.6 mg CChE/g) que el extracto acuoso por lo que es probable que la mayor cantidad y diversidad de compuestos polifenólicos del extracto etanólico esté en relación con el efecto observado. Estos resultados están en concordancia con los de Padilla y colaboradores que evidenciaron una

relación directa entre el efecto vasodilatador en aortas aisladas de rata con el contenido en fenoles de vinos españoles (Padilla et al., 2005).

Se tiene el conocimiento que el endotelio es el principal regulador de la vasodilatación del músculo liso vascular debido a que este libera sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico y las prostaglandinas que son liberadas en procesos que afectan la homeostasia vascular (Badimón and Martínez-González, 2006). De esta manera, este resultado indicaría una acción favorable para la regulación del músculo liso vascular, que permitiría la continuación de la investigación sobre esta propiedad particular del extracto etanólico de *Quercus scytophylla*.

En estudios realizados por Mamani-Choquepata et al., 2013 se obtuvo un efecto vasodilatador de un extracto hidroalcohólico del maíz morado (*Zea mays L.*) este efecto se atribuye a la concentración de antocianinas presentes en el maíz morado. Lo que confirma, como en nuestra investigación, que existe una actividad vasodilatadora debida a la realización de extractos vegetales con solventes hidroalcohólicos.

Onzaga et al., 2008 le atribuye un efecto vasodilatador a *C. prunifolia* cuando realizó un extracto etanólico de ella, obteniendo una fracción flavonoide de la que se presume un efecto vasorrelajante al ser contraídas las arterias con KCl, en nuestro estudio sin embargo se utilizó L-name como constrictor, pero en ambos casos se confirma la actividad de sustancias vasorelajantes presentes al realizar extractos vegetales con solventes hidroalcohólicos.

La relajación dependiente del endotelio se alcanza por una combinación de acción de óxido nítrico, prostaciclina y factor hiperpolarizante derivados del endotelio (Montes et al., 2005). Los resultados de este estudio no mostraron una diferencia significativa en el efecto relajante del extracto acuoso y etanólico de encino *Quercus scytophylla* en anillos sin endotelio, lo cual indica que mecanismos dependientes del endotelio no están envueltos en su acción.

Los estudios en órgano aislado se consideran como una técnica útil para evaluar los efectos de fármacos y extractos derivados de plantas en el

músculo liso. Sin embargo, la técnica de órgano aislado vascular presenta como desventaja la dificultad de mantener el tejido viable para los ensayos farmacológicos. A pesar de ello, las investigaciones relacionadas con los efectos vasorrelajantes de algunas especies vegetales utilizadas principalmente en la medicina tradicional han sido de gran interés para encontrar una opción para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis que señala que estos extractos acuoso y etanólico de *Quercus scytophylla* efectivamente poseen un efecto relajante de la musculatura lisa arterial y por lo tanto, se puede determinar que efectivamente es un regulador de la actividad músculo liso vascular, de manera independiente a la presencia del endotelio vascular.

VIII. CONCLUSIONES

Los extractos de *Quercus scytophylla* mostraron baja toxicidad en el modelo de *Artemia franciscana*. Sin embargo, se observó ligeramente una mayor toxicidad producida por el extracto acuoso y se observó un claro efecto vasodilatador con el extracto etanólico.

IX. RECOMENDACIONES

Aunque los resultados del trabajo constituyen una primera etapa que permitió conocer la toxicidad del extracto acuoso y etanólico de cortezas de *Quercus scytophylla*, estudios agudos, subagudos y crónicos en roedores y no-roedores deben ser realizados con vistas a establecer los efectos tóxicos de estos extractos en modelos animales más complejos.

Estudios ulteriores deben también realizarse para elucidar los mecanismos de relajación implicados en la acción del extracto etanólico en ausencia de endotelio y determinar las moléculas responsables de dicha actividad.

X. BIBLIOGRAFÍA

- A. González, J. D. (2001). Estrés oxidativo vascular y disfunción endotelial. *Nefrología*, 21, 61-66.
- Actividad antioxidante y efecto genotóxico en células HeLa de compuestos fenólicos de infusiones de hojas de *Quercus resinosa* - ScienceDirect. (s. f.).
Recuperado 16 de febrero de 2019, de
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609000910>
- Aguilar, J; Rojas, P. Marcelo, A. Plaza, A. Bauer, R. Reininger, E. Klaas, C. A, & Merfort. I. 2003.- Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *J. Ethnopharmacol.*, 81 (2): 271-277.
- Aleebrahim-Dehkordy, E., Rafieian-kopaei, M., Amini-Khoei, H., & Abbasi, S. (2018). In Vitro Evaluation of Antioxidant Activity and Antibacterial Effects and Measurement of Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Quercus brantii* L. Fruit Extract. *Journal of Dietary Supplements*, 0(0), 1-9.
<https://doi.org/10.1080/19390211.2018.1470126>
- Arámbula-Salazar, J. A., Ibarra-Salinas, B. I., González-Laredo, R. F., Muñoz-Galindo, O. D., & Hernández-Vela, H. (2010). Variación estacional de compuestos fenólicos foliares en *Quercus sideroxyla* en diferentes tipos de suelo. *Madera y bosques*, 16(3), 49-59.
art54_2009.pdf. (s. f.). Recuperado de
http://www.ru.tic.unam.mx:8080/bitstream/handle/123456789/1529/art54_2009.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Arbeláez, L.F.G., Pardo, A.C., Fantinelli, J.C., Schinella, G.R., Mosca, S.M., Ríos, J.-L., 2018. Cardioprotection and natural polyphenols: an update of clinical and experimental studies. *Food Funct.* 9, 6129–6145.
<https://doi.org/10.1039/C8FO01307A>

- Ávila-Sánchez, P., Sánchez-González, A., Catalán-Heverástico, C., Almazán-Núñez, R. C., Jiménez-Hernández, J., Ávila-Sánchez, P., ... Jiménez-Hernández, J. (2018). Patrones de riqueza y diversidad de especies vegetales en un gradiente altitudinal en Guerrero, México. *Polibotánica*, (45), 101-113. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.45.8>
- Badimón, L., & Martínez-González, J. (2006). Disfunción endotelial. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 6(1), 21A-30A. [https://doi.org/10.1016/S1131-3587\(06\)74817-8](https://doi.org/10.1016/S1131-3587(06)74817-8)
- Barboza, L. S. (2015). Control borroso para la valoración del impacto ambiental generado por contaminantes emergentes en aguas residuales hospitalarias. *Gestión y Ambiente*, 18(1), 81-93.
- Barceló, L. D. (2007). *Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes*. 1, 27.
- Barrera-Catalán, E., Herrera-Castro, N. D., Catalán-Heverástico, C., & Ávila-Sánchez, P. (2015). Plantas medicinales del municipio de Tixtla de Guerrero, México. *Revista fitotecnica mexicana*, 38(1), 109-111.
- Bello-González, M. (2009). *Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos* (México D.F.). Recuperado de https://books.google.com.mx/books?id=Ag7IXoQ8L9cC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Biziuk, M., Przyjazny, A., Czerwinski, J., & Wierowski, M. (1996). Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. *Journal of Chromatography A*, 754(1), 103-123. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00297-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00297-X)
- Brine shrimp lethality and acute oral toxicity studies on *Swietenia mahagoni* (Linn.) Jacq. seed methanolic extract [Internet]. [citado 11 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3141130/>

- Cartagena, C. J. (2011). Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmaceuticos. *Revista Lasallista de investigación*, 8(2), 143-153.
- Cartagena, C. J. (s. f.). *Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmaceuticos*. 11.
- Castellanos, J. R. S., Pérez, M. R., & Cerón, J. B. O. (2014). Caracterización en flexión estática de madera plastificada de *Quercus scytophylla*. *Ciencia Nicolaita*, 0(62), 17-33.
- Castro-Vázquez, L., Alañón, M. E., Ricardo-da-Silva, J. M., Pérez-Coello, M. S., & Laureano, O. (2013). Evaluation of Portuguese and Spanish *Quercus pyrenaica* and *Castanea sativa* species used in cooperage as natural source of phenolic compounds. *European Food Research and Technology*, 237(3), 367-375. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-1999-5>
- CASTRO, L.; ALZATE, M. & GUERRERO, G. E. 2010.- Estudio preliminar de la bioactividad de extractos de semillas de *Annona cherimolia* de la familia Annonaceae. *Scientia Et Technica* 44: 326-330.
- Cock I, Mpala L, Chikowe G. No evidence of antiseptic properties and low toxicity of selected Aloe species. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*. 2010;1(1):10.
- Cock I, Mpala L, Chikowe G. No evidence of antiseptic properties and low toxicity of selected Aloe species. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*. 2010;1(1):10.
- CONICET_Digital_Nro.22309.pdf. (s. f.). Recuperado de https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/18511/CONICET_Digital_Nro.22309.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Domínguez-Vázquez, G., & Castro-Ramírez, A. E. (2015). Usos Medicinales de la Familia Labiatae en Chiapas, México. *ETNOBIOLOGÍA*, 2(1), 19-31.

- Dragos, D., Gilca, M., Gaman, L., Vlad, A., Iosif, L., Stoian, I., & Lupescu, O. (2017).
Phytomedicine in Joint Disorders. *Nutrients*, 9(1).
<https://doi.org/10.3390/nu9010070>
- Drózdź, P., & Pyrzynska, K. (2018). Assessment of polyphenol content and
antioxidant activity of oak bark extracts. *European Journal of Wood and
Wood Products*, 76(2), 793-795. <https://doi.org/10.1007/s00107-017-1280-x>
- Durán, M. G., & Alvarez, M. J. M. (2000). EVALUACIÓN DE ALGUNAS MEZCLAS
DE SOLVENTES EN LA EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES DEL
PERICARPIO DE TAMARILLO: (Cyphomandra betacea Sendt)
EVALUATION OF SEVERAL SOLVENT MIXTURES IN THE EXTRACTION
OF CAROTENOIDS FROM THE PERICARP OF TAMARILLO
(Cyphomandra betacea Sendt) AVALIACIÓN DALGUNHAS MEZCLAS DE
SOLVENTES NA EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES DO PERICARPIO
DE TAMARILLO (Cyphomandra betacea Sendt). *Ciencia y Tecnologia
Alimentaria*, 3(1), 34-38. <https://doi.org/10.1080/11358120009487646>
- Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de
compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de
Pinus durangensis y Quercus sideroxyla. (s. f.). Recuperado 7 de
septiembre de 2019, de [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-
221X2016005000061&script=sci_arttext&tlng=en](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-221X2016005000061&script=sci_arttext&tlng=en)
- Elesgaray, R., Costa, M. A., Caimi, M., Balaszczuk, A. M., & Arranz, C. T. (2005).
Participación del receptor MPR-C en la activación de la sintetasa de óxido
nitrico inducida por el péptido natriurético auricular en el corazón, la arteria
aorta y el riñon. *Revista Argentina de Cardiología*, 73(2). Recuperado de
<http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=305323887006>
- Esquivel-Gutiérrez, E. R., Noriega-Cisneros, R., Bello-González, M. A., Saavedra,
A., & Salgado-Garciglia, R. (2012). *Plantas utilizadas en la medicina*

tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas.

14(1), 9.4

Esquivel-García R, Velázquez-Hernández ME, Valentín-Escalera J, Valencia-Avilés E, Rodríguez-Orozco AR, **García-Pérez ME** (2018) Flavonoids from *Quercus* genus: Applications in melasma and psoriasis. Chemistry of lignocellulosics: Current trends. Francis & Taylor. Chapter 11. Pp:251-277 ISBN 9781498775694

EVALUACIÓN DE ALGUNAS MEZCLAS DE SOLVENTES EN LA EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES DEL PERICARPIO DE TAMARILLO: (Cyphomandra betacea Sendt) EVALUATION OF SEVERAL SOLVENT MIXTURES IN THE EXTRACTION OF CAROTENOIDS FROM THE PERICARP OF TAMARILLO (Cyphomandra betacea Sendt) AVALIACIÓN DALGUNHAS MEZCLAS DE SOLVENTES NA EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES DO PERICARPIO DE TAMARILLO (Cyphomandra betacea Sendt): Ciencia y Tecnología Alimentaria: Vol 3, No 1. (s. f.). Recuperado 7 de septiembre de 2019, de <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11358120009487646>

FINNEY, D.L. 1978. - Statistical Method in Biological Assay, London and High Wycombe, UK.

Fiori, L., Faveri, D. de, Casazza, A. A., & Perego, P. (2009). Grape by-products: extraction of polyphenolic compounds using supercritical CO₂ and liquid organic solvent – a preliminary investigation Subproductos de la uva: extracción de compuestos polifenólicos usando CO₂ supercrítico y disolventes orgánicos líquidos – una investigación preliminar. CyTA - Journal of Food, 7(3), 163-171. <https://doi.org/10.1080/11358120902989715>

FLÓREZ-LONDOÑO, Y. & MARTÍNEZ-MUÑOZ, E. 2010.- Obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de *Annona muricata* de la región cafetera. Tesis de Grado. pp. 87

- Gil, M. J., Soto, A. M., Usma, J. I., & Gutiérrez, O. D. (2013). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia*, 7(2). Recuperado de <http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/pl/article/view/265>
- Gómez Álvarez, R. (2012). Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, México. *Revista fitotecnica mexicana*, 35(1), 43-49.
- Gómez, P. (2005, mayo). La medicina tradicional como medicina ecocultural [Info:eu-repo/semantics/article]. Recuperado 31 de octubre de 2018, de http://www.ugr.es/~pwlac/G21_10Alfonso_Aparicio_Mena.html
- Gorgonio-Ramírez, M., Clark Tapia, R., Campos, J. E., Monsalvo Reyes, A., Alfonso Corrado, C., Gorgonio-Ramírez, M., ... Alfonso Corrado, C. (2017). Diversidad y estructura genética de *Quercus crassifolia* en sitios de manejo forestal y uso local en Sierra Juárez, Oaxaca. *Madera y bosques*, 23(2), 85-98. <https://doi.org/10.21829/myb.2017.2321122>
- Graciano-Ávila, G., Aguirre-Calderón, Ó. A., Alanís-Rodríguez, E., Lujan-Soto, J. E., Graciano-Ávila, G., Aguirre-Calderón, Ó. A., ... Lujan-Soto, J. E. (2017). Composición, estructura y diversidad de especies arbóreas en un bosque templado del Noroeste de México. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 4(12), 535-542. <https://doi.org/10.19136/era.a4n12.1114>
- Guerrero, M., Carrón, R., & Martín, M. (2003). Identificación de la actividad hipotensora del extracto etanólico de *Solanum tuberosum* en ratas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 32(1). Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/1674>
- Halder M, Balls M. Implementation of three Rs alternatives in regulatory testing:possibilities and obstacles-the view of the validator. *Developmental Biology (Basel)* 2002; 111:199-206.
- Guntero, V. A., Martini, R. E., Longo, M. B., Ciparicci, S., & Andreatta, A. E. (2015). *Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos*

- de la industria vitivinícola. Recuperado de
<http://ria.utn.edu.ar/xmlui/handle/123456789/2976>
- Hoskins, W. M.; Craig, R. (1 de enero de 1962). «Uses of Bioassay in Entomology». *Annual Review of Entomology* 7 (1): 437-464. ISSN 0066-4170.
doi:10.1146/annurev.en.07.010162.002253.
- Huggins J. Alternatives to animal testing: research, trends, validation, regulatory acceptance. *Alternatives to Animal Experimentation* 2003; 20:3-61.
- Iribarra P, V., Germain A, A., Cuevas M, A., Faúndez G, L., & Valdés S, G. (2000). Disfunción endotelial como alteración primaria en las patologías vasculares. *Revista médica de Chile*, 128(6), 659-670. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872000000600014>
- Isman MB. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Ann Rev Entomol.* 2006;51:45-66.
- Isman MB. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Ann Rev Entomol.* 2006;51:45-66.
- Isman MB. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Ann Rev Entomol.* 2006;51:45-66.
- Ivania Morera Rodríguez. Identificación de principios activos de plaguicidas en frutas, hortalizas y granos básicos en Costa Rica: Una propuesta para la implementación de nuevas metodologías de análisis. 20 de octubre de 2015;15:155-71.
- Jiménez, B. E. (2001). *La Contaminación Ambiental en México*. Editorial Limusa.
- Khenouf, S., Amira, S., Arrar, L., & Baghiani, A. (2010). *Effect of some phenolic compounds and Quercus Tannins on lipid pero.* 7.
- Kim, M.-H., Park, D.-H., Bae, M.-S., Song, S.-H., Seo, H.-J., Han, D.-G., ... Cho, S.-S. (2018). Analysis of the Active Constituents and Evaluation of the

- Biological Effects of *Quercus acuta* Thunb. (Fagaceae) Extracts. *Molecules*, 23(7), 1772. <https://doi.org/10.3390/molecules23071772>
- Lambert, S., & Wagner, M. (2018). Microplastics Are Contaminants of Emerging Concern in Freshwater Environments: An Overview. En M. Wagner & S. Lambert (Eds.), *Freshwater Microplastics : Emerging Environmental Contaminants?* (pp. 1-23). https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5_1
- Lagarto A, Silva R, Guerra I, Iglesias L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. 2001;8(5):395-400.
- Laska, E M; Meisner, M J (1 de abril de 1987). «Statistical Methods and Applications of Bioassay». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 27 (1): 385-397. ISSN 0362-1642. doi:10.1146/annurev.pa.27.040187.002125.
- LEBOEUF, M.; CAVE, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B. & MUKHERJEE, R. 1982. - The phytochemistry of Annonaceae. *Phytochemistry*, 21 (12): 2783–2813.
- LEWAN, L.; ANDERSSON, M. & MORALES-GÓMEZ, P.1992.- The use of *Artemia salina* in toxicity. *Testing Alternatives Lab. Anim.*, 20: 297-301.
- Liebeke, M., Strittmatter, N., Fearn, S., Morgan, A. J., Kille, P., Fuchser, J., ... Bundy, J. G. (2015). Unique metabolites protect earthworms against plant polyphenols. *Nature Communications*, 6, 7869. <https://doi.org/10.1038/ncomms8869>
- LOCK, O. 1994.- Investigación Fitoquímica. En: Métodos en el Estudio de Productos Naturales. Fondo Editorial PUCP, Lima, Perú.
- Londoño-Londoño, J. A. (s. f.). *Aprovechamiento de residuos de la agroindustria de cítricos: extracción y caracterización de flavonoides*. 22.

- López Hernández, O. D., Márquez Conde, T., Salomón Izquierdo, S., & González Sanabia, M. L. (2009). Extracción de lípidos de las semillas de Cucurbita pepo L. (calabaza). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(2), 0-0.
- Luna José, A. de L., Montalvo Espinosa, L., & Rendón Aguilar, B. (2003). Los usos no leñosos de los encinos en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (72). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=57707204>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Martínez Hernández, H. (2006). Los aneurismas de la aorta torácica y su enfoque terapéutico. *Archivos de cardiología de México*, 76, 124-133.
- Martínez-Ramírez, A., & Contreras-Esquivel, J. C. (2010). EXTRACCION DE POLIFENOLES ASISTIDA POR MICROONDAS A PARTIR. (4), 5.
- McGonigle, I. V. (2016). Patenting nature or protecting culture? Ethnopharmacology and indigenous intellectual property rights. *Journal of Law and the Biosciences*, 3(1), 217-226. <https://doi.org/10.1093/jlb/lsw003>
- McLaughlin JL, Lingling LR, Anderson JE. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information J.* 1998;32:513-524.
- Mc LAUGHLIN, J.; COLMAN-SAZARBITORIA, T. & ANDERSON, J. 1995.- Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. *Rev. Soc. Ven. Quim.*, 18: 13-21.
- MEYER, B.M.; FERRIGNI, N.R.; PUTMAN, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E. & Mc LAUGHLIN, J.L. 1982.- Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.*, 45 (1): 31-34.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 1982; 45:31-34.,

- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Plant Med.* 1982;45:31-4.
- Muñoz, I. M. M., & Rojas, V. E. S. (s. f.). SOMETIDAS A ESTRÉS OXIDATIVO". 47.
- Nili-Ahmadabadi, H., Emami, M. H., & Omidifar, N. (2017). Effectiveness of *Quercus brantii* hydroalcoholic extract on dyspepsia: A randomized, double blind clinical trial. *Journal of Education and Health Promotion*, 6(1), 62.
https://doi.org/10.4103/jehp.jehp_31_17
- OCAMPO, D. M. 2009.- Seguimiento cromatográfico de algunos principios bioactivos presentes en *Annona cherimolioides* (Annonaceae). *Vector* 2: 103–112.
- Ocaranza, M. P., Moya, J., Pinto, M., Escudero, N., Valenzuela, F., Varas, M., ... Jalil, J. (2010). Menores niveles tisulares de la enzima convertidora de angiotensina I homologa (ECA-2) y angiotensina-(1-9) están asociados a mayor remodelamiento de la pared aórtica de ratas hipertensas. *Revista chilena de cardiología*, 29(1), 69-82. <https://doi.org/10.4067/S0718-85602010000100007>
- Olson, M. E. (2009, abril 2). *Quercus* [Imagen]. Recuperado 31 de octubre de 2018, de http://siba.unam.mx/irekani/handle/123456789/3711?mode=full&submit_simple=Muestra+el+registro+Dublin+Core+completo+del+%C3%ADtem&proyecto=Irekani
- Olvera, E. et al.,. (2017). *Acta Botanica Mexicana* 118. *Acta Botanica Mexicana*, (118), 1. <https://doi.org/10.21829/abm118.2017.1207>
- Paaver, U., Matto, V., & Raal, A. (s. f.). *Total tannin content in distinct Quercus robur L. galls*. 5.

- Patiño, Y., Díaz, E., & García, S. O. (2014). Microcontaminantes emergentes en aguas: tipos y sistemas de tratamiento. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 5(2), 1-20.
- PDGA_Rousseau_2_Unidad_3.pdf. (s. f.). Recuperado de http://www.terras.edu.ar/biblioteca/5/PDGA_Rousseau_2_Unidad_3.pdf
- Pino Pérez O, Jorge Lazo F, Tacoronte Morales JE, Khambay BPS. Aislamiento y caracterización de compuestos activos de *Mammea americana* L. *Revista Cubana de Química*. 2007;19(1):74-7
- Potosí Gutiérrez, A., Villalba Malaver, J. C., & Arboleda-Pino, L. Y. (2017). NON-TIMBER FOREST PRODUCTS ASSOCIATED OAK FOREST *Quercus humboldtii* Bonpl IN LA VEGA, CAUCA. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(2), 22-29.
[https://doi.org/10.18684/BSAA\(15\)22-29](https://doi.org/10.18684/BSAA(15)22-29)
- «Principles Involved in Bioassay by different Methods: A Mini-Review». *Research and Reviews: Research Journal of Biology*.
- Prinsloo, Gerhard; Papadi, Georgia; Hiben, Mebrahtom G.; Haan, Laura de; Louisse, Jochem; Beekmann, Karsten; Vervoort, Jacques; Rietjens, Ivonne M.C.M. «In vitro bioassays to evaluate beneficial and adverse health effects of botanicals: promises and pitfalls». *Drug Discovery Today* 22 (8): 1187-1200. doi:10.1016/j.drudis.2017.05.002.
- R, C. M. F., H, P. A., & Jesús, L. H. D. (2014). La Etnofarmacología y los Bioensayos como nuevas estrategias en la investigación fitoquímica de la flora medicinal peruana. *Ciencia e Investigación*, 4(2), 20-36.
- Rakić, S., Povrenović, D., Tešević, V., Simić, M., & Maletić, R. (2006). Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food. *Journal of Food Engineering*, 74(3), 416-423. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.057>

- Ramírez, Jorge, & Palacios, Mauricio, & Gutiérrez, Oscar (2006). Estudio del efecto antihipertensivo de la *Salvia scutellarioides* en un modelo de ratas hipertensas. *Colombia Médica*, 37(1), undefined-undefined. [fecha de Consulta 20 de Octubre de 2019]. ISSN: 0120-8322. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=283/28337108>
- Rangel, S. R., Carlos, E., Zenteno, R., de Lourdes, M., & Enríquez, A. (2002). El Género *Quercus* (Fagaceae) en el Estado de México. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 89(4), 551-593. <https://doi.org/10.2307/3298595>
- Repetto, M. Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group. Tercera edición; 2002. p.303-305.
- Rissato, S. R., Galhiane, M. S., & Gerenutti, M. (2005). Método Multiresiduo para determinar Pesticidas en Frutas por Extracción con Fluido Supercrítico. *Información tecnológica*, 16(6), 13-19. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642005000600003>
- Rivero Martínez, R., Rodríguez Leyes, E. A., Menéndez Castillo, R., Fernández Romero, J. A., Barrio Alonso, G. del, & González Sanabia, M. L. (2002). Obtención y caracterización preliminar de un extracto de *Aloe vera* L. con actividad antiviral. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 7(1), 32-38.
- Roig Bondia, J. (2014). *Eliminación de contaminantes emergentes mediante humedales artificiales como sistema alternativo o complementario a un tratamiento de aguas convencional*. Recuperado de <https://riunet.upv.es/handle/10251/44470>
- Rtibi, K., Hammami, I., Selmi, S., Grami, D., Sebai, H., Amri, M., & Marzouki, L. (2017). Phytochemical properties and pharmacological effects of *Quercus ilex* L. aqueous extract on gastrointestinal physiological parameters in vitro

and in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 787-793.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.008>

- Rubio Clemente, A., Chica Arrieta, E. L., & Peñuela Mesa, G. A. (2013). Procesos de tratamiento de aguas residuales para la eliminación de contaminantes orgánicos emergentes. *Ambiente & Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 8(3). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=92829234008>
- Ruiz-Aquino, F., González-Peña, M. M., Valdez-Hernández, J. I., Romero-Manzanares, A., Ruiz-Aquino, F., González-Peña, M. M., ... Romero-Manzanares, A. (2016). Estructura anatómica de la madera de dos encinos de Oaxaca. *Madera y bosques*, 22(1), 177-189.
- Sabás-Rosales, J. L., Siqueiros-Delgado, M. E., Valencia-Ávalos, S., Enríquez-Enríquez, E. D., Sabás-Rosales, J. L., Siqueiros-Delgado, M. E., ... Enríquez-Enríquez, E. D. (2017). Reconocimiento taxonómico de seis especies arbustivas de encinos (*Quercus* secc. *Quercus*: Fagaceae). *Polibotánica*, (44), 11-38. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.44.2>
- Sabás-Rosales, J. L., Sosa-Ramírez, J., & Luna-Ruiz, J. de J. (2015). Diversidad, distribución y caracterización básica del hábitat de los encinos (*Quercus*: Fagaceae) del Estado de San Luis Potosí, México. *Botanical Sciences*, 93(4), 881-897. <https://doi.org/10.17129/botsci.205>
- SHAMMA, M. 1972.- "The isoquinoline alkaloids: Chemistry and Pharmacology", Academic Press, Verlag nChemie, NY, USA.
- Sakar, M. K., Hretog, D. S., Zalp, M. O., Eki, M., Piacente, S., & Pizza, C. (s. f.). *Polyphenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Quercus aucheri* Leaves. 5.
- Saleem, T. M., Azeem, A., Dilip, C., Sankar, C., Prasanth, N., & Duraisami, R. (2011). Anti-inflammatory activity of the leaf extacts of *Gendarussa vulgaris*

Nees. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), 147-149.

[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60014-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60014-2)

Salgado-Terrones, O., Borda-Niño, M., Ceccon, E., Salgado-Terrones, O., Borda-Niño, M., & Ceccon, E. (2017). Uso y disponibilidad de leña en la región de La Montaña en el estado de Guerrero y sus implicaciones en la unidad ambiental. *Madera y bosques*, 23(3), 121-135.

<https://doi.org/10.21829/myb.2017.2331473>

Sanabria-Galindo, A., López, S. I., & Gualdrón, R. (1997). ESTUDIO FITOQUIMICO PRELIMINAR Y LETALIDAD SOBRE ARTEMIA SALINA DE PLANTAS COLOMBIANAS. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 26(1). Recuperado de

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/56452>

SANABRIA-GALINDO, A.; LOPEZ, S.I. & GUALDRON, R. 1997.- Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre Artemia salina de plantas colombianas. *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm.*, 26 (1): 15-19.

Sanabria-Galindo A, López SI, Gualdrón R. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre Artemia salina de plantas colombianas. *Rev Col Cienc Quím Farm.* 1997;26:15-9.

Sánchez-Burgos, J. A., Ramírez-Mares, M. V., Larrosa, M. M., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Medina-Torres, L., & Rocha-Guzmán, N. E. (2013). Antioxidant, antimicrobial, antitopoisomerase and gastroprotective effect of herbal infusions from four *Quercus* species. *Industrial Crops and Products*, 42, 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.017>

Sánchez-González, A. (2008). Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y bosques*, 14(1), 107-120.

Simón, A., Castro, A., & Kaski, J. C. (2001). Avances en el conocimiento de la disfunción endotelial y su aplicación en la práctica clínica. *Revista Cubana de Medicina*, 40(3), 212-222.

sm051e.pdf. (s. f.). Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/sanmil/sm-2005/sm051e.pdf>

Solís PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Plant Med.* 1993;59:250-2.

Soto-García, M., & Rosales-Castro, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxyla*. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 18(4), 701-714.
<https://doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>

Soto-García, M., Rosales-Castro, M., Escalona-Cardoso, G. N., & Paniagua-Castro, N. (2016). Evaluation of Hypoglycemic and Genotoxic Effect of Polyphenolic Bark Extract from *Quercus sideroxyla*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4032618>

Sotomayor Castellanos, J. R., & Olguín Cerón, J. B. (2014). Caracterización mecánica por ondas de esfuerzo de madera plastificada de *Quercus scytophylla*. *Investigación y Ciencia*, 22(61). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=67431579005>

Tawaha KA. Cytotoxicity Evaluation of Jordanian Wild Plants using Brine Shrimp Lethality Test. 8(1):6.,

Tamarit Urias, J. C., Rojas Díaz, E., Quiñonez Barraza, G., Ordoñez Prado, C., Monárrez González, J. C., Tamarit Urias, J. C., ... Monárrez González, J. C. (2017). Sistema de cubicación para árboles individuales de *Quercus* sp. en bosques bajo manejo de Puebla, México. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 8(40), 69-88.

Tejada, C., Quiñonez, E., & Peña, M. (2014). Contaminantes Emergentes en Aguas: Metabolitos de Fármacos. Una Revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 80. <https://doi.org/10.18359/rfcb.341>

Tesis_Calra_Sirtori.pdf. (s. f.). Recuperado de

https://www.psa.es/es/areas/tsa/docs/Tesis_Calra_Sirtori.pdf

Torres, L. O., Contreras, A. A., & Pérez, M. E. T. (2005). *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico*. Edicions Universitat Barcelona.

Valdés-Iglesias O, Díaz N, Cabranes Y, Acevedo ME, Areces AJ, Graña L, et al. Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuente de extractos bioactivos. *Avicennia*. 2003;16:36-45.

Valencia A., S. (2004). Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (75). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=57707503>

Valencia-Avilés, E., García-Pérez, M., Garnica-Romo, M., Figueroa-Cárdenas, J., Meléndez-Herrera, E., Salgado-Garciglia, R., ... Martínez-Flores, H. E. (2018). Antioxidant Properties of Polyphenolic Extracts from *Quercus Laurina*, *Quercus Crassifolia*, and *Quercus Scytophylla* Bark. *Antioxidants*, 7(7), 81. <https://doi.org/10.3390/antiox7070081>

Valencia-Avilés, E., Ignacio-Figueroa, I., Sosa-Martínez, E., Bartolomé-Camacho, M. C., Martínez-Flores, E., & García-Pérez, M.-E. (2017). *Polyphenols: antioxidant and toxicological properties*. (16), 15.

Vázquez-Cabra, B. D., Moreno-Jiménez, M. R., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., González-Herrera, S. M., Gamboa-Gómez, C. I., & González-Laredo, R. F. (2016a). Mexican oaks as a potential non-timber resource for Kombucha beverages. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, XXII(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=62943324006>

Vázquez-Cabra, B. D., Moreno-Jiménez, M. R., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., González-Herrera, S. M., Gamboa-Gómez, C. I., & González-Laredo, R. F. (2016b). Mexican oaks as a potential non-timber resource for Kombucha beverages. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, XXII(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=62943324006>

Vázquez-Cabral, B. D., Moreno-Jiménez, M. R., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., González-Herrera, S. M., Gamboa-Gómez, C. I., ... González-

- Laredo, R. F. (2016). Encinos mexicanos, un recurso no maderable con potencial para elaborar bebidas tipo Kombucha. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 22(1), 73-86.
<https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2015.04.014>
- Verdejo París, J. (2006). Función endotelial. *Archivos de cardiología de México*, 76, 164-169.
- Viegas, K. A. S., Orsi, A. M., Matheus, S., Francia-Farje, L. A. D., Orsi, D. C., & Mello, J. M. (2001). CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA AORTA DE CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*). *Revista chilena de anatomía*, 19(2), 131-137. <https://doi.org/10.4067/S0716-98682001000200002>
- Xu, J., Wang, X., Yue, J., Sun, Y., Zhang, X., Zhao, Y., ... Zhao, Y. (2018). Polyphenols from Acorn Leaves (*Quercus liaotungensis*) Protect Pancreatic Beta Cells and Their Inhibitory Activity against α -Glucosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B. *Molecules*, 23(9), 2167.
<https://doi.org/10.3390/molecules23092167>
- Youn, S. H., Kwon, J. H., Yin, J., Tam, L. T., Ahn, H. S., Myung, S. C., ... Lee, M. W. (2017). Anti-Inflammatory and Anti-Urolithiasis Effects of Polyphenolic Compounds from *Quercus gilva* Blume. *Molecules*, 22(7), 1121.
<https://doi.org/10.3390/molecules22071121>
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules*, 21(5), 559.
<https://doi.org/10.3390/molecules21050559>
- Zhang, B., Cai, J., Duan, C.-Q., Reeves, M. J., & He, F. (2015). A Review of Polyphenolics in Oak Woods. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 6978-7014. <https://doi.org/10.3390/ijms16046978>
- Zhang, X., Li, J., Chen, M., Wu, L., Zhang, C., Zhang, J., ... Liang, Y. (2011). Toxicity of the brominated flame retardant tris-(2,3-dibromopropyl) isocyanurate in zebrafish (*Danio rerio*). *Chinese Science Bulletin*, 56(15), 1548-1555. <https://doi.org/10.1007/s11434-011-4471-6>