



**Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**



**Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera**

**Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera**

“Escrutinio fitoquímico y evaluación de la actividad biológica de extractos de  
madera”

**Tesis**

Para obtener el Título de:

**Maestra en Ciencias y Tecnología de la Madera**

Presenta:

**Q.F.B Malinali Ambriz Ortiz**

Director de tesis:

**D.C. Crisanto Velázquez Becerra**

Co- director:

**D.C. Josué Altamirano Hernández**

Morelia, Michoacán, marzo del 2019

## Dedicatoria

A mi esposo, **Brian**, por ser un gran hombre que me ha entregado su amor y confianza de manera incondicional y por todos estos años a mi lado en donde día a día nos hemos superado.

A mis padres, **Javier** y **María del pilar** por siempre tener un consejo, por su apoyo y su paciencia en educarme y enseñarme siempre serán mi ejemplo a seguir.

A mi hermano **Inti** gracias por siempre apoyarme cuando más lo necesitaba, por ser la persona que siempre me hizo fuerte, por ser ese hombre genial y buena persona.

A mi hermano **Gu yen** por cumplir bien tu papel de hermano menor, ser un buen hombre, y por hacerme orgullosa.

A mis hermosos sobrinos **Misha** y **Daivath** por hacerme una tía orgullosa, feliz y por recordarme lo hermoso que es ser niño.

A mí cuñada **Michelle** por ser una gran madre, amiga y demostrar que siempre se puede hacer más.

# Índice

Índice .....	이
Índice de figuras .....	목
Índice de tablas .....	구
Lista de abreviaturas .....	일영
Agradecimientos .....	일이
1. Resumen .....	1
2. Abstract .....	3
3. Introducción .....	5
3.1 Composición química de la madera.....	5
<b>Tabla i</b> Compuestos primarios en la madera de coníferas y latifoliadas (%). .....	5
3.2 Metabolismo secundario en los árboles.....	6
3.2.1 Terpenos.....	6
3.2.2 Compuestos fenólicos .....	7
3.2.3 Características químicas de los polifenoles .....	8
3.2.4 Metabolitos secundarios que contienen nitrógeno .....	10
3.2.5 Otros metabolitos.....	11
3.3 Actividad biológica .....	11
3.4 <i>Eysenhardtia polystachya</i> .....	16
3.5 <i>Pinus pseudostrobus</i> .....	18
3.6 <i>Pinus leiophylla</i> .....	20
3.7 <i>Pinus montezumae</i> .....	21
0	

4. Justificación.....	23
5. Objetivos .....	24
6. Materiales y Métodos .....	25
6.1 Material biológico .....	25
6.1.1 Material vegetal .....	25
6.1.2 Obtención de los extractos.....	25
6.2 Experimentos <i>in vitro</i> .....	26
6.2.1 Análisis fitoquímico preliminar para identificación parcial de metabolitos secundarios .....	26
6.2.2 Extracción y cuantificación de fenoles .....	26
6.2.3 Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> .....	27
6.2.4 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de madera por el método de DPPH <sup>-</sup> .....	27
6.2.5 Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de madera por el método ABTS <sup>+</sup> .....	28
6.2.6 Evaluación del poder antioxidante reductor de Hierro (FRAP).....	28
6.3 Actividad insecticida de los extractos de corteza de <i>Pinus</i> y madera de <i>E. polystachya</i> mediante el cálculo de la DL <sub>50</sub> en el modelo biológico de <i>Anopheles aegypti</i> .	29
6.4 Efecto tóxico de extractos de corteza de <i>Pinus</i> y madera de <i>E. polystachya</i> por medio del cálculo de la concentración letal 50 en el modelo <i>A. salina</i> .....	30
6.4.1 Crecimiento de <i>Artemia salina</i> .....	30
6.4.2 Determinación de la concentración de los extractos crudos para BSLT .....	31
6.4.3 Determinación de DL <sub>50</sub> .....	31
6.5 Actividad antioxidante <i>in vivo</i> .....	32
6.5.1 Estrés oxidativo causado con Peróxido de Hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	33
6.6 Análisis microbiológico.....	34

6.6.1	Preparación del inóculo .....	34
6.6.2	Siembra de la muestra.....	34
6.6.3	Prueba de sensibilidad por medio de la técnica de sensidisco .....	34
6.6.4	Medición de los halos de inhibición .....	35
6.6.5	Técnica de inhibición de crecimiento en placa .....	35
6.7	Análisis estadístico .....	35
7.	Resultados .....	36
7.1	Evaluación del rendimiento de las extracciones con solventes en el proceso de soxhlet en las 3 diferentes especies de <i>Pinus</i> y la especie tropical <i>E. polystachya</i> .....	36
7.2	Experimentos <i>in vitro</i> .....	37
7.2.1	Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (FOLIN).....	37
7.2.2	Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH .....	38
7.2.3	Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS <sup>+</sup> .....	38
7.2.4	Determinación de la capacidad antioxidante por el método FRAP .....	39
7.3	Experimentos <i>in vivo</i> .....	41
7.3.1	Actividad insecticida de extractos acuosos de corteza de especies de <i>P. pseudostrobus</i> y <i>P. montezuma</i> en el modelo biológico <i>Anopheles aegypti</i> .....	41
7.3.2	Actividad insecticida de extractos acetónicos de corteza de especies de <i>P. montezuma</i> y <i>P. leiophylla</i> en el modelo biológico <i>Anopheles aegypti</i> .....	41
7.3.3	Actividad insecticida de extractos metanólicos de madera de <i>E. polystachya</i> en el modelo biológico <i>Anopheles</i> .....	42
7.3.4	Actividad insecticida del extracto tetrahidrofuranólico de madera de <i>E. polystachya</i> en el modelo biológico <i>Anopheles</i> .....	43
7.3.5	Efecto tóxico del extracto metanólico de <i>P. montezumae</i> por medio del cálculo de la concentración letal 50 en el modelo <i>A. salina</i> .....	44
7.3.6	Efecto tóxico del extracto metanólico de <i>P. leiophylla</i> por medio del cálculo de la concentración letal 50 en el modelo <i>A. salina</i> .....	45

7.3.7	Efecto tóxico del extracto metanólico de <i>E. polystachya</i> por medio del cálculo de la concentración letal 50 en el modelo <i>A. salina</i> .....	46
7.3.8	Efecto tóxico del extracto tetrahidrofuranólico de <i>E. polystachya</i> por medio del cálculo de la concentración letal 50 en el modelo <i>A. salina</i> .....	47
7.3.9	Experimentos <i>in vivo</i> para evaluar el efecto protector de los extractos en la tolerancia al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en el modelo biológico <i>C. Elegans</i> N2 .....	48
7.3.9.1	Efecto protector de los extractos en la tolerancia al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en el modelo biológico <i>C. Elegans</i> N2 a dosis de 40 µg/mL .....	49
7.3.9.2	Efecto protector de los extractos en la tolerancia al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en el modelo biológico <i>C. Elegans</i> N2 a dosis de 80 µg/mL .....	50
7.3.10	Medición del efecto antibacteriano en <i>M. luteus</i> por medio de la técnica sensidisco en extractos de <i>Pinus sp.</i> y <i>E. polystachya</i> .....	51
7.3.10.1	Medición del efecto antibacteriano por medio de la técnica sensidisco en extractos acuosos de corteza en especies de <i>P. pseudostrobus</i> y <i>P. montezumae</i> .....	52
7.3.10.2	Medición del efecto antibacteriano por medio de sensidisco en extractos acetónicos de corteza en especies de <i>P. montezumae</i> y <i>P. leiophyla</i> .....	53
7.3.10.3	Medición del efecto antibacteriano por medio de sensidisco en extractos metanólicos de corteza en especies de <i>Pinus</i> .....	54
7.3.10.4	Medición del efecto antibacteriano por medio de sensidisco en los extractos metanólicos de madera en especie de <i>E. polystachya</i> .....	55
7.3.10.5	Medición del efecto antibacteriano por medio de sensidisco en los extractos metanólicos de corteza y madera de la especie <i>E. polystachya</i> .....	56
7.3.11	Medición del efecto antifúngico a dosis de 350 y 400 µg de extractos de madera de <i>E. polystachya</i> y corteza de <i>Pinus sp.</i> .....	57

8. Discusión.....	60
9. Conclusiones .....	65
10. Perspectivas .....	66
11. Bibliografía.....	67
12. Anexos.....	76

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Estructura química de diferentes compuestos fenólicos. ....	8
<b>Figura 2</b> Principales clases de polifenoles modificado de Pandey, et al. 2009 .....	9
<b>Figura 3</b> Clasificación de los flavonoides modificado de Pandey, et al. 2009.....	10
<b>Figura 4</b> Naftoquinonas naturales.....	13
<b>Figura 5</b> A) Descripción botánica de Sargent, (1892) y B) Árbol de <i>Eysenhardtia polystachya</i> .....	17
<b>Figura 6</b> A) Árbol y ramas, B) Corteza, C) Hojas, D) Semillas y alas, E) Conos de <i>Pinus pseudostrobus</i> . ....	19
<b>Figura 7</b> A) Conos, ramas y B) Árbol de <i>Pinus leiophylla</i> . ....	21
<b>Figura 8</b> A) Árbol, B) Cono, C) Distribución geográficas en México, y D) Ramas de <i>Pinus Montezumae</i> . ....	22
<b>Figura 9</b> Foto que ilustra la morfología típica de la larva de 3 <sup>er</sup> estadio de <i>A. aegypti</i> . La flecha roja indica la presencia de la larva en DMSO al 1%. 2x. ....	30
<b>Figura 10</b> Foto que ilustra la morfología de los nauplios de <i>A. salina</i> . La flecha roja indica la presencia del nauplio en DMSO 1%. 4x.....	31
<b>Figura 11</b> Ciclo de vida del nematodo <i>C. elegans</i> (Worm Atlas, 2018). ....	33

<b>Figura 12</b> Contenido total de fenoles de los extractos de corteza de las tres especies de <i>Pinus sp.</i> y madera de la especie de <i>E. polystachya</i> .	37
<b>Figura 13</b> Capacidad antioxidante para la eliminación del radical DPPH de los extractos de corteza de las tres especies de <i>Pinus sp.</i> y madera de la especie de <i>E. polystachya</i> .	38
<b>Figura 14</b> Capacidad antioxidante para la eliminación del carbocatión ABTS <sup>+</sup> de los extractos de corteza de las tres especies de <i>Pinus sp.</i> y madera de la especie de <i>E. polystachya</i> .	39
<b>Figura 15</b> Capacidad antioxidante para la capacidad reductora del Fe <sup>+3</sup> a Fe <sup>+2</sup> de los extractos de corteza de tres especies de <i>Pinus sp.</i> y la madera de la especie de <i>E. polystachya</i> .	40
<b>Figura 16</b> Proporción promedio de supervivencia en <i>A. salina</i> a 0, 12, y 24 horas frente a las concentraciones de 0, 20, 40, 60 y 80 µg/mL.	44
<b>Figura 17</b> Proporción promedio de supervivencia en <i>A. salina</i> a 0, 12, y 24 horas frente a las concentraciones de 0, 20, 40, 60 y 80 µg/mL.	45
<b>Figura 18</b> Proporción promedio de supervivencia en <i>A. salina</i> a 0, 12, y 24 horas frente a las concentraciones de 0, 20, 40, 60 y 80 µg/mL.	46
<b>Figura 19</b> Proporción promedio de supervivencia en <i>A. salina</i> a 0, 12, y 24 horas frente a las concentraciones de 0, 20, 40, 60 y 80 µg/mL.	47
<b>Figura 20</b> A. Nematodos vivos se observan curvos. B. Nematodos muertos se observan rectos. La flecha roja indica la presencia del nematodo. 60x.	48
<b>Figura 21</b> A) Extracto metanólico de <i>P. pseudostrobus</i> (MPP), extracto metanólico de <i>P. montezumae</i> (MPM), extracto metanólico de <i>P. leiophylla</i> (MPL), extracto metanólico de <i>E. polistachya</i> (MEP). B) Extracto tetrahidrofuránico de <i>E. polistachya</i> (TEP).	49
<b>Figura 22</b> Extracto metanólico de <i>P. pseudostrobus</i> (MPP), extracto metanólico de <i>P. montezumae</i> (MPM), Extracto metanólico de <i>P. leiophylla</i> (MPL), extracto metanólico de <i>E. polistachya</i> (MEP) y extracto tetrahidrofuránico de <i>E. polistachya</i> (TEP).	50
<b>Figura 23</b> Amikacina fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. La zona de inhibición se midió en (mm).	51
<b>Figura 24</b> Captan fue usado a una dosis de 400 µg como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %.	57

<b>Figura 25</b> Curva de calibración para fenoles totales equivalentes a ácido gálico ( $\mu\text{moles } \acute{\text{a}}\text{c. gálico/g peso fresco}$ ).....	76
<b>Figura 26</b> Curva de calibración de ensayo DPPH. ....	77
<b>Figura 27</b> Curva de calibración de ensayo ABTS <sup>+</sup> .....	78
<b>Figura 28</b> Curva de calibración de ensayo FRAP. ....	79
<b>Figura 29</b> Proporción promedio de la supervivencia de <i>A. aegypti</i> frente a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ en los extractos de corteza de las tres especies de <i>Pinus sp.</i> y madera de la especie de <i>E. polystachya</i> .).....	83
<b>Figura 30</b> Proporción promedio de la supervivencia de <i>A. aegypti</i> frente a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ en los extractos de corteza de las tres especies de <i>Pinus sp.</i> y madera de la especie de <i>E. polystachya</i> .....	84
<b>Figura 31</b> Dosis Letal <sub>50</sub> de <i>A. salina</i> frente a la concentración de 70, 50, 40 y 30 $\mu\text{g/mL}$ en los extractos de corteza de las tres especies de <i>Pinus sp.</i> y madera de la especie de <i>E. polystachya</i> .....	84
<b>Figura 32</b> Amikacina fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Actividad antibacteriana de <i>M. luteus</i> frente a la concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$ en los extractos de corteza de las tres especies de <i>Pinus sp.</i> y madera de la especie de <i>E. polystachya</i> .....	85
<b>Figura 33</b> Amikacina fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Actividad antibacteriana de <i>C.jejuji</i> frente a la concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$ en los extractos de corteza de las tres especies de <i>Pinus sp.</i> y madera de la especie de <i>E. polystachya</i> .....	86
<b>Figura 34</b> Amikacina fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Actividad antibacteriana de <i>R. picketti</i> frente a la concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$ en los extractos de corteza de las tres especies de <i>Pinus sp.</i> y madera de la especie de <i>E. polystachya</i> .....	86
<b>Figura 35</b> Captan fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Actividad antibacteriana de <i>K. palustris</i> frente a la concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$ en los extractos de corteza de las tres especies de <i>Pinus sp.</i> y madera de la especie de <i>E. polystachya</i> .....	87

**Figura 36** Captan fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Actividad antibacteriana de *G. traveum* frente a la concentración de 400 µg/mL en los extractos de corteza de las tres especies de *Pinus sp.* y madera de la especie de *E. polystachya*. ..... 87

## Índice de tablas

<b>Tabla i</b> Compuestos primarios en la madera de coníferas y latifoliadas (%) .....	5
<b>Tabla ii</b> Distribución en porcentaje de compuestos secundarios de la madera.....	6
<b>Tabla iii</b> Porcentaje de rendimiento obtenido de los extractos de cuatro especies de árboles utilizando la ecuación modificada de Happel y Jordan (Pág. 25). .....	36
<b>Tabla iv</b> Análisis de supervivencia en <i>Anopheles aegypti</i> frente a extractos acuosos de <i>P. pseudostrobus</i> y <i>P. montezumae</i> .....	41
<b>Tabla v</b> Análisis de supervivencia en <i>Anopheles aegypti</i> frente a extractos acetónicos de <i>P. montezumae</i> y <i>P. leiophylla</i> .....	42
<b>Tabla vi</b> Análisis de supervivencia en <i>Anopheles aegypti</i> frente a extractos metanólicos de <i>P. pseudostrobus</i> y <i>P. montezumae</i> .....	42
<b>Tabla vii</b> Análisis de supervivencia en <i>Anopheles aegypti</i> frente a extractos metanólicos de <i>P. leiophylla</i> y <i>E. polystachya</i> .....	43
<b>Tabla viii</b> Análisis de supervivencia en <i>Anopheles aegypti</i> frente al extracto tetrahidrofuranólico de <i>E. polystachya</i> .....	43
<b>Tabla ix</b> Actividad antibacteriana de extractos acuosos de <i>Pinus sp.</i> .....	52
<b>Tabla x</b> Actividad antibacteriana de extractos acetónicos de <i>Pinus sp.</i> .....	53
<b>Tabla xi</b> Actividad antibacteriana de extractos metanólicos de <i>Pinus sp.</i> .....	54

<b>Tabla xii</b> Actividad antibacteriana de extractos metanólicos de <i>P. leiophyla</i> y <i>E. polystachya</i> .....	55
<b>Tabla xiii</b> Actividad antibacteriana del extracto tetrahidrofuranólico de <i>E. polystachya</i> ....	56
<b>Tabla xiv</b> Efecto antifúngico de los extractos de madera y corteza .....	58
<b>Tabla xv</b> Supervivencia de <i>A. salina</i> en los extractos acuosos.....	80
<b>Tabla xvi</b> Supervivencia de <i>A. salina</i> en los extractos acetónicos .....	80
<b>Tabla xvii</b> Supervivencia de <i>A. salina</i> en los extractos metanólicos.....	80

## Lista de abreviaturas

**ABTS<sup>•+</sup>**: Radical ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

**AC**: Extracto acetónico

**AtC**: Átomos de carbono

**BSLT**: Brine Shrimp Lethality Test

***Caenorhabditis elegans* N2**: Aislante silvestre de *Caenorhabditis elegans*. DR subclon de CB original (patrón Tc1 I), homocigoto para la mutación alh-2.

**CAET**: Capacidad Antioxidante equivalentes a TROLOX

**DL<sub>50</sub>**: Dosis letal cincuenta

**DMSO**: Dimetilsulfóxido

**DPPH**: Radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

**EAG g<sup>-1</sup>**: miliequivalentes gramo de ácido gálico

**ERO**: Especies Reactivas del Oxígeno

**ERN**: Especies Reactivas de Nitrógeno

**FRAP:** Poder antioxidante de la reducción férrica

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de Hidrógeno

**HCL:** Ácido Clorhídrico

**HCT-166:** Línea celular (células de cáncer de colon)

**HI-60:** Línea celular (células de leucemia promielocítica humana)

**IPA:** Alcohol isopropílico

**IPP2:** isopentenil pirofosfato

**MEPP:** Extracto metanólico *Peltophorum pterocarpum*

**MET:** Extracto metanólico

**MS:** Metabolitos secundarios

**nm:** nanómetros

**(p/p):** peso/peso

**RL:** Radicales libres

**THF:** Extracto tetrahidrofuranólico

**TPTz:** 2, 4, 6-tripiridil-s-triazina

**WA:** Water activity / Actividad del agua/ Extracto acuoso

**WT:** Wild Tipe/Cepa Silvestre

## **Agradecimientos**

*Al Dr. **Crisanto Velázquez Becerra**, por sus consejos, su asesoría y su apoyo recibido durante la realización de este trabajo y por haberme recibido en su laboratorio, siempre estará presente.*

*Al Dr. **Josué Altamirano Hernández**, por su amistad, su asesoría, sus consejos y su gran apoyo en la realización de las pruebas antioxidantes in vivo e in vitro y las pruebas citotóxicas durante la realización de este trabajo y por haberme recibido en su laboratorio.*

*Al Dr. **Rafael Herrera Bucio**, por su asesoría y su apoyo recibidos durante la realización de este trabajo y por haberme recibido en su laboratorio para la obtención de los extractos de madera de *E. polystachya*.*

*Al Dr. José Guadalupe Rutiaga Quiñones, por su apoyo brindado y por haberme recibido en su laboratorio para la obtención de los extractos de madera de Pinus sp.*

*A la M.C. Abril Munro Rojas, por su amistad, su apoyo prestado y su constancia en cada una de mis evaluaciones muchas gracias por su tiempo.*

*A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y en particular al Posgrado en Ciencias y Tecnología de la Madera de la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera por mi formación académica.*

Tesis apoyada por la **Coordinación de Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**.

Tesis apoyada por **UMSNH** a través de la beca de la Comisión de Becas del H. Consejo Universitario.

## 1. Resumen

Los árboles son uno de los principales organismos productores de recursos naturales y compuestos químicos capaces de prevenir y curar enfermedades, por ejemplo el compuesto químico anticancerígeno paclitaxel aislado de la corteza del árbol *Taxus brevifolia*. Una alternativa como tratamiento para diversas afecciones es el uso de extractos de madera y corteza, ya que presentan actividad citotóxica y antioxidante debido a su composición rica en fenoles. Para el aprovechamiento de la corteza obtenida al realizar la pica en Michoacán para la extracción de resina que no tiene utilidad comercial, por otro lado se analizó un árbol medicinal también endémico utilizado para infecciones y se emplearon para su uso en estos extractos como coadyuvantes capaces de retrasar las complicaciones de múltiples enfermedades crónico-degenerativas e infecciosas, por lo tanto el propósito de éste trabajo fue evaluar la actividad biológica de los extraíbles de madera de *Eysenhardtia polystachya* y corteza de *Pinus pseudostrobus*, *leiophylla* y *montezumae*, en donde se realizó la extracción acetónica (AC), tetrahidrofuranólica (THF), metanólica (MET) y acuosa (WA), para los ensayos *in vitro* los compuestos fenólicos se cuantificaron mediante el método de Folin-Ciocalteu, la actividad antioxidante se determinó mediante las técnicas DPPH<sup>·</sup>, ABTS<sup>·+</sup> y FRAP, para las pruebas *in vivo*, se utilizó el modelo biológico de *Artemia salina* para evaluar la Dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), por otro lado, el nematodo *Caenorhabditis elegans* N2 (WT) se sometió a estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para evaluar la capacidad protectora y antioxidante *in vivo* por medio de la DL<sub>50</sub>, también se analizó el efecto antimicrobiano y antifúngico de los extractos, por medio de halo de inhibición en las bacterias *Ralstonia picketti*, *Campylobacter jejuni*, *Kocuria palustris* y *Micrococcus luteus*, y por medio de la sensibilidad de crecimiento en placa en los hongos saprófitos de pudrición de madera *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum traveum*. Los resultados *in vitro* mostraron el mayor contenido fenólico en *E. polystachya* que arrojó una concentración total de fenoles de 2.77 mg de ácido gálico (EAG g<sup>-1</sup>) en el extracto metanólico y 2.5 EAG g<sup>-1</sup> en el extracto de THF, el extracto acetónico de *P. montezumae* arrojó una concentración total de fenoles de 1.04 EAG g<sup>-1</sup> y el extracto acetónico de *P. leiophylla* de 0.92 EAG g<sup>-1</sup>. Así mismo, en las pruebas antioxidantes se observó una mayor actividad para reducir el radical DPPH<sup>·</sup>, en el extracto metanólico de *E. polystachya* y el extracto acetónico de *P. montezumae* con valores de 0.116 y 0.115 μM TROLOX mL<sup>-1</sup>. En la prueba antioxidante de ABTS<sup>·+</sup> el extracto metanólico de *P. pseudostrobus*, *P. montezumae* y acetónico de *P. leiophylla* presentaron una mayor actividad para reducir éste radical con valores de 235.32, 185.89 y 183.69 μM TROLOX mL<sup>-1</sup>. En la determinación de la capacidad antioxidante por el método poder antioxidante de la reducción férrica los valores más elevados se obtuvieron en las especies de *E. polystachya* y *P. pseudostrobus* de 65.33 y 59.14 μM TROLOX mL<sup>-1</sup>

de los extractos metanólicos. Los extractos de *Pinus* y *E. polystachya* evaluados tienen actividad antioxidante *in vitro*. Además, la evaluación de toxicidad en *A. salina* demostró que la administración de los extractos metanólicos de *P. montezumae*, *P. leiophylla* y *E. polystachya* y el extracto de THF de éste último, incrementaron los niveles de mortalidad siendo potenciales candidatos para su estudio en ensayos anticancerígenos. Por otro lado en el modelo de *C. Elegans* los extractos metanólicos de *P. leiophylla* y *E. polystachya* y el extracto de THF de éste último tuvieron un efecto citoprotector de entre 70 y 80 % de supervivencia cuando se administró en la dosis de extracto de 40 y 80 µg/mL, en una concentración de 15 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En cuanto a la actividad antimicrobiana se observó que la administración de los extractos en bacterias a los que se les determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) no tuvo un efecto significativo esto se puede deber a la resistencia microbiana a compuestos químicos. En cuanto a la actividad antifúngica no presentó efecto significativo en la inhibición de crecimiento en placa y sobre la madera, se puede deber tanto la cantidad como la calidad particular de los extractivos que tienen un papel clave, pero su contribución relativa varía considerablemente de un organismo a otro. En conclusión, los extractos de *Pinus sp.* consisten principalmente en polifenoles y los extractos de *E. polystachya* se componen de ácidos fenólicos, además, los extractos polares de estas especies presentaron actividad tóxica en *A. salina*, también, son capaces de neutralizar las EROS en el modelo de *C. elegans*, lo que aumenta su expectativa de vida, mientras que en los ensayos antimicrobianos se observó una tendencia de inhibición del crecimiento bacteriano. Se considera que la administración de los extractos polares de las especies de *Pinus* y *E. polystachya*, reducen el daño oxidativo provocado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tienen potencial para su uso en ensayos anticancerígenos.

**Palabras clave:** Árbol, compuesto natural, antioxidante, solvente, extraíble.

## 2. Abstract

Trees are one of the main organisms that produce natural resources and chemical compounds capable of preventing and curing diseases, such as the anti-cancer chemical compound paclitaxel isolated from the bark of the tree *Taxus brevifolia*. An alternative as a treatment for various conditions is the use of wood and bark extracts, since they present cytotoxic and antioxidant activity due to their composition rich in phenolic compounds. Taking advantage of the bark obtained when making “la pica” in Michoacán for the extraction of resin that has no commercial use, on the other hand a medicinal tree also endemic used for infections and were used for their use in these extracts as adjuvants capable of delaying complications of multiple chronic-degenerative and infectious diseases, therefore the purpose of this work was to evaluate the biological activity of the wood extractables of *Eysenhardtia polystachya* and bark of *Pinus pseudostrobus*, *leiophylla* and *montezumae*, where the extraction was carried out by acetic (AC), tetrahydrofuranolic (THF), methanolic (MET) and aqueous (WA), for the *in vitro* tests the phenolic compounds were quantified by the Folin-Ciocalteu method, the antioxidant activity was determined by the techniques DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> and FRAP, for the *in vivo* tests, the biological model of *Artemia salina* used in toxicological and preliminary studies for the evaluation of plant compounds with anticancer potential evaluating the lethal dose 50 (LD<sub>50</sub>), on the other hand, the nematode *Caenorhabditis elegans* N2 (WT) underwent oxidative stress with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to evaluate the protective and antioxidant capacity *in vivo* by means of the LD<sub>50</sub>, the antimicrobial and antifungal effect of the extracts was also analyzed, by means of inhibition halo in the human opportunistic bacteria: *Ralstonia picketti*, *Campylobacter jejuni*, *Kocuria palustris* and *Micrococcus luteus*, and by means of growth sensitivity in plate in the wood rot saprophytes *Trametes versicolor* and *Gloeophyllum traveum*. The *in vitro* results showed the highest phenolic content in *E. polystachya* which yielded a total concentration of phenols of 2.77 mg of gallic acid (EAG g<sup>-1</sup>) in the methanolic extract and 2.5 EAG g<sup>-1</sup> in the extract of THF, the extract Acetone from *P. montezumae* yielded a total concentration of phenols of 1.04 EAG g<sup>-1</sup> and the acetic extract of *P. leiophylla* of 0.92 EAG g<sup>-1</sup>. Likewise, in the antioxidant tests a greater activity was observed to reduce the DPPH<sup>•</sup> radical, in the methanolic extract of *E. polystachya* and the acetic extract of *P. montezumae* with values of 0.116 and 0.115 μM TROLOX mL<sup>-1</sup> respectively. In the antioxidant test of ABTS<sup>•+</sup> the methanolic extract of *P. pseudostrobus*, *P. montezumae* and acetic of *P. leiophylla* presented a greater activity to reduce this radical with values of 235.32, 185.89 and 183.69 μM TROLOX mL<sup>-1</sup> respectively. In the determination of the antioxidant capacity by the antioxidant power of iron reduction method, the highest values were found in the *E. polystachya* and *P. pseudostrobus* species of 65.33 and 59.14 μM TROLOX mL<sup>-1</sup>, respectively,

of the methanolic extracts. The extracts of *Pinus* and *E. polystachya* evaluated have antioxidant activity *in vitro*. In addition, the evaluation of toxicity in *A. salina* showed that the administration of the methanolic extracts of *P. montezumae*, *P. leiophylla* and *E. polystachya* and the THF extract of the latter increased the mortality levels being potential candidates for study. In anticancer trials. On the other hand, in the *C. Elegans* model, the methanolic extracts of *P. leiophylla* and *E. polystachya* and the THF extract of the latter had a cytoprotective effect of between 70 and 80% survival when administered in the extract dose. 40 and 80 µg / mL, at a concentration of 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Regarding the antimicrobial activity, it was observed that the administration of the extracts in bacteria to which the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined did not have a significant effect, this may be due to the microbial resistance to chemical compounds. Regarding the antifungal activity, there was no significant effect on the inhibition of growth in plaque and on wood, both the quantity and the particular quality of the extractives that have a key role may be due, but their relative contribution varies considerably from one organism to another. to another. In conclusion, the extracts of *Pinus* sp. They consist mainly of polyphenols and the extracts of *E. polystachya* are composed of phenolic acids, in addition, the polar extracts of these species showed toxic activity in *A. salina*, they are also capable of neutralizing the EROS in the *C. elegans* model, that increases its life expectancy, while in antimicrobial assays a tendency of inhibition of bacterial growth was observed. It is considered that the administration of the polar extracts of the species of *Pinus* and *E. polystachya*, reduce the oxidative damage caused by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and have potential for their use in anticancer assays.

**Keywords:** Tree, natural compound, antioxidant, solvents, extractable.

### 3. Introducción

Los bosques albergan una gran parte de la diversidad biológica conocida y presentan un papel fundamental en los ciclos del agua y carbono, en la regulación del clima. A su vez, minimizan el riesgo de inundaciones, evitan la erosión reteniendo el suelo fértil y son una importante fuente de madera, alimentos, medicamentos y muchos otros recursos naturales (Hernández, *et al.* 2008). La corteza y madera están conformadas químicamente con los componentes de la pared celular; celulosa, lignina y por sustancias extraíbles, que se forman a partir del metabolismo secundario de las plantas y que contienen compuestos variados como terpenos, grasas, ceras, fenoles, pigmentos y azúcares, entre otros. Esta composición química depende de factores diversos como edad, especie, condiciones del árbol y localización (Rosales, *et al.* 2003). El contexto de medio ambiente de donde provienen los materiales lignocelulósicos, pueden ser las especies de árboles Angiospermas (latifoliadas), Gimnospermas (coníferas, abetos, etc.) y monocotiledóneas (gramíneas y palmas) extraídas de Áreas Bajo Régimen de Administración Especial ABRAE (Reservas Forestales, bosques naturales, plantaciones forestales, etc.), así como también de plantaciones privadas (Contreras, *et al.* 2005).

#### 3.1 Composición química de la madera

La madera está compuesta íntegramente por células (unidas mediante una membrana de lignina) que le proporcionan las diferentes propiedades fisicoquímicas, formando además la unidad básica de su constitución (celulosa). Las células de la madera son elementos complejos que se encuentran formados por dos tipos de componentes (primarios y secundarios), y cuyas cantidades varían según el tipo de árbol de que se trate. Los elementos primarios, definen sus propiedades físicas y mecánicas, están compuestos por celulosa, hemicelulosa y lignina (ver Tabla i). Los elementos secundarios son importantes impregnaciones, extrañas a la propia pared celular, están compuestos por Carbono, Oxígeno, Hidrógeno, Nitrógeno y Cenizas (ver Tabla ii).

**Tabla i** Compuestos primarios en la madera de coníferas y latifoliadas (%).

	Coníferas	Latifoliadas
Celulosa	50	50
Hemicelulosa	23	26
Lignina	27	24

**Tabla ii** Distribución en porcentaje de compuestos secundarios de la madera.

Carbono	50%
Oxígeno	44%
Hidrógeno	6%
Cenizas	0.50%
Nitrógeno	0.10%

### 3.2 Metabolismo secundario en los árboles

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, nitrógeno y energía termina en moléculas comunes (aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos), necesarias para el funcionamiento celular de los organismos. En plantas estas moléculas se denominan metabolitos primarios y desempeñan las mismas funciones. Pero a diferencia de otros organismos, destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos y lípidos, que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios o productos naturales) (Ávalos, *et al.* 2009).

Los metabolitos secundarios (MS) además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Ávalos, *et al.* 2009).

Los metabolitos secundarios de las plantas se dividen en tres grupos químicamente distintos: los terpenos, compuestos fenólicos y compuestos que contienen nitrógeno.

#### 3.2.1 Terpenos

Los terpenos constituyen el grupo más numeroso de MS (más de 40,000 moléculas diferentes). La biosíntesis es a partir de acetyl-CoA o intermediarios glucolíticos. Son insolubles en agua, se derivan de la

unión de elementos de cinco carbonos que tienen el esqueleto de carbono ramificado de isopentano. Los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno [5 átomos de carbono (AtC)] que contienen: los terpenos de 10 AtC contienen dos unidades de isopreno y se llaman monoterpenos; los de 15 AtC tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos; y los de 20 AtC tienen cuatro unidades de isopreno y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 AtC, los tetraterpenos tienen 40 AtC y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (Taiz y Zeiger, 2002).

Los terpenos se sintetizan a partir de metabolitos primarios en al menos dos formas diferentes, por la vía del ácido mevalónico y por la ruta del metilentitrol fosfato. En la vía del ácido mevalónico, tres moléculas de acetil-CoA se unen paso a paso para formar ácido mevalónico, este intermediario clave de seis carbonos se pirofosforila, descarboxila y deshidrata para producir isopentenil pirofosfato (IPP2), un bloque de construcción de terpenos activado de cinco carbonos (Taiz y Zeiger, 2002).

Recientemente, se descubrió que el IPP2 también puede formarse a partir de intermediarios de glucólisis o el ciclo de reducción de carbono fotosintético a través de un conjunto separado de reacciones llamado ruta del metilentitrol fosfato que funciona en cloroplastos y otros plastidios. Este grupo está compuesto por hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos cardiacos), látex y aceites esenciales (proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas) (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Asimismo, presentan diversas actividades biológicas, por ejemplo, algunos terpenos como los iridoides tienen propiedades antiinflamatoria, antimicrobiana y amebicida. Por otro lado, las saponinas, presentan actividades anticancerígenas, hipocolesterolemia y antiinflamatoria (López-Carreras, *et al.* 2012).

### **3.2.2 Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son un grupo químicamente heterogéneo de casi 8,000 compuestos individuales y se caracterizan por tener uno o varios grupos fenoles (Fig. 1) (Taiz y Zeiger, 2002). Desempeñan diversas funciones fisiológicas como intervenir en el crecimiento y reproducción de las plantas. (Pandey, *et al.* 2009). Existe una gran variedad de estos compuestos, entre ellos: los fenoles simples, los ácidos fenólicos, los flavonoides que poseen 2 subunidades fenólicas, los taninos que tienen 3 subunidades fenólicas o más, entre otros (Esquivel-Gutiérrez, *et al.* 2013). Además, se encuentra los pigmentos vegetales como las naftoquinonas (Fig. 1) que tienen como característica estructural poseer dos grupos

carbonilo en las posiciones 1,4 y con menor frecuencia en 1,2 o 1,3 en el anillo del naftaleno, de donde deriva su nombre común (López, *et al.* 2011).

Se sintetizan a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido shiquímico y la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido shiquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas (Quiñones, *et al.* 2012).



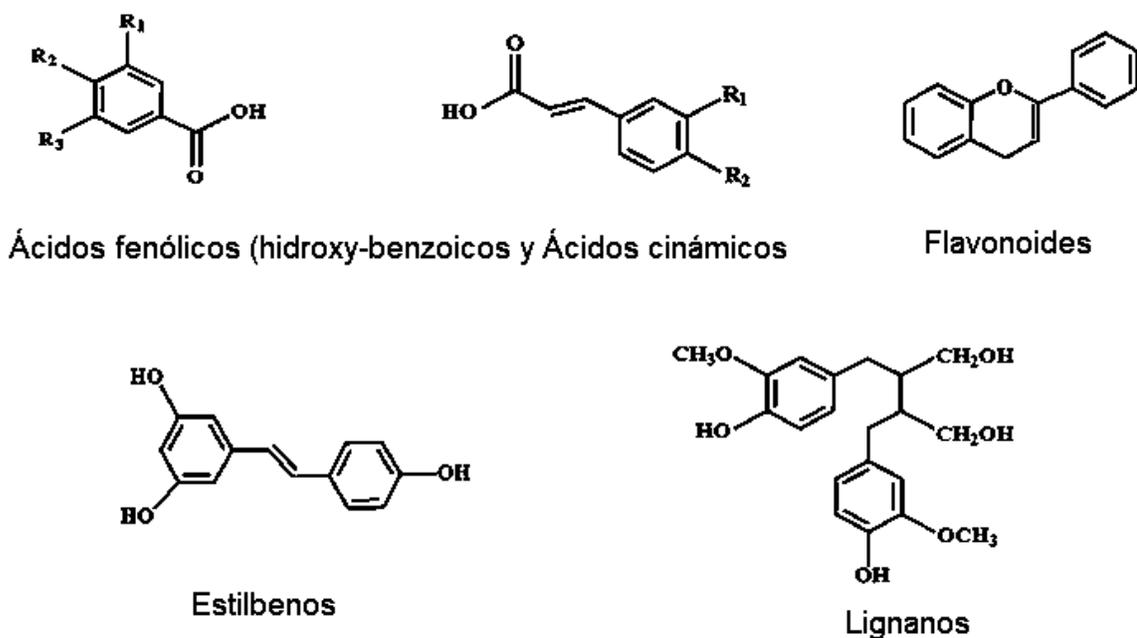
**Figura 1** Estructura química de diferentes compuestos fenólicos.

### 3.2.3 Características químicas de los polifenoles

El grupo de los polifenoles abarca a todas las sustancias extractivas monoméricas y oligoméricas de la madera que poseen en su estructura dos o más grupos fenólicos libres o esterificados por metilos. Se los suele dividir en tres grupos: lignanos, que poseen la estructura de fragmentos de lignina, flavonoides y elagitaninos. Tanto los flavonoides como los elagitaninos poseen propiedades tánicas, es decir coagulan las proteínas animales en solución. Los flavonoides se encuentran como monómeros o en la forma denominada taninos condensados, los elagitaninos también se llaman taninos hidrolizables pues se encuentran habitualmente como glucósidos, las agliconas de los mismos son insolubles en casi todos los solventes comunes. La mayoría de los polifenoles de la madera son coloreados. Los elagitaninos poseen colores claros preferentemente amarillos, y los taninos condensados rojos oscuros o marrones, durante los procesos de pulpado estas sustancias se disuelven en gran proporción, pero no por completo. Lo que queda en las pulpas le confieren color. El color puede ser el propio o debido a complejos que forman con cationes metálicos, principalmente los de los elementos de transición (Nuñez, *et al.* 2009).

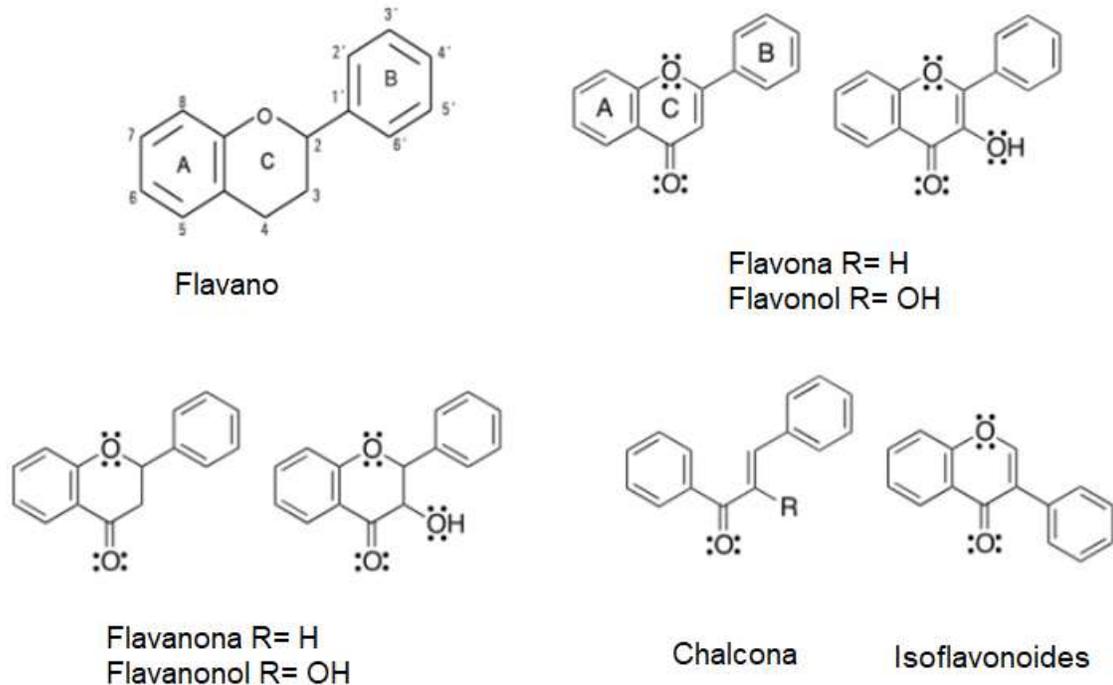
Todos los compuestos fenólicos vegetales surgen de un intermedio común, la fenilalanina, o un precursor cercano, el ácido shiquímico. Principalmente se presentan en formas conjugadas, con uno o más residuos de azúcar unidos a grupos hidroxilo, aunque también existen enlaces directos del azúcar (polisacárido o monosacárido) con un carbono aromático. También es común la asociación con otros compuestos, como ácidos carboxílicos y orgánicos, aminas, lípidos y enlaces con otros fenoles (Pandey, *et al.* 2009).

Los polifenoles (Fig. 2) pueden clasificarse en diferentes grupos en función del número de anillos de fenol que contienen en base a elementos estructurales que unen estos anillos entre sí. Las clases principales incluyen ácidos fenólicos, flavonoides (Fig. 3), estilbenos y lignanos (Pandey, *et al.* 2009). Los trabajos conocidos sobre la distribución radial de polifenoles en la madera, muestran un patrón consistente en un aumento paulatino desde el cambium hasta la interfase albura duramen y una posterior disminución hacia la médula, siendo esta última menor que la necesaria para llegar al bajo tenor del cambium, es decir que hay en general mayor contenido de polifenoles en el duramen. Los trabajos sobre distribución de polifenoles abarcan géneros como *Sequoia*, *Pseudtsuga*, *Tectona* y *Acacia* (Nuñez, *et al.* 2009).



**Figura 2** Principales clases de polifenoles modificado de Pandey, *et al.* 2009.

En la medicina tradicional a estos metabolitos secundarios se les atribuyen efectos terapéuticos como antiparasitarios, antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes y anticancerígenos (Rosales, *et al.* 2003).



**Figura 3** Clasificación de los flavonoides modificado de Pandey, *et al.* 2009.

### 3.2.4 Metabolitos secundarios que contienen nitrógeno

Contienen nitrógeno en su estructura, éstos incluyen a los alcaloides y glucósidos cianogénicos, algunos miembros de este grupo son tóxicos para los seres humanos y otros presentan efectos terapéuticos. La mayoría de los metabolitos secundarios nitrogenados se biosintetizan a partir de aminoácidos comunes (Taiz y Zeiger, 2002).

Los alcaloides son una gran familia de más de 15,000 metabolitos secundarios que tienen en común las siguientes características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos, aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mecalina o la colchicina. Se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

La mayoría de estos metabolitos secundarios son alcalinos, presentando valores de pH de 7.2 en el citosol y en la vacuola un pH alrededor de 5 a 6. El átomo de nitrógeno está protonado, por lo tanto, los alcaloides tienen carga positiva y generalmente son solubles en agua (Taiz y Zeiger, 2002). En los seres humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas debido a la interacción con los neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor

terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antitusivos o analgésicos. Se sintetizan a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

### 3.2.5 Otros metabolitos

Los glucósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glucosídico que se forma cuando una molécula de glucosa se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glucósidos:

**Saponinas:** se conocen como glucósidos esteroideos, glucósidos esteroideos alcaloides o glucósidos triterpenos. Por lo tanto, son triterpenoides o esteroides que presentan una o más moléculas de glucosa en su estructura. Se pueden presentar como agluconas, es decir, sin la glucosa (terpeno sin la glucosa), se denominan sapogeninas. La adición de un grupo hidrofílico (glucosa) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

**Glucósidos cardiacos:** son semejantes a las saponinas esteroideas, presentan propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Se encuentran de forma natural en forma de glucósidos o de agluconas. Un miembro importante de este grupo es la digitoxina, o su análogo digoxina, aislada de *Digitalis purpurea* y utilizada como tratamiento para la insuficiencia cardiaca congestiva (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

**Glucósidos cianogénicos:** son compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos, pero se degradan cuando la planta es dañada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno. Un ejemplo es la amigdalina que se encuentra en las semillas de almendra, albaricoque, cereza o melocotón (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

## 3.3 Actividad biológica

Entre los antioxidantes hay varias familias de compuestos químicos como los polifenoles y los fitoestrógenos. Entre los primeros se encuentran los flavonoides y los taninos, ampliamente estudiados. Entre los flavonoides se pueden señalar sólo como ejemplo las antocianidinas (rojo-azulado de las fresas), catequinas (té verde y negro), citroflavonoides (naranja, que da sabor amargo a lo naranja, limón,

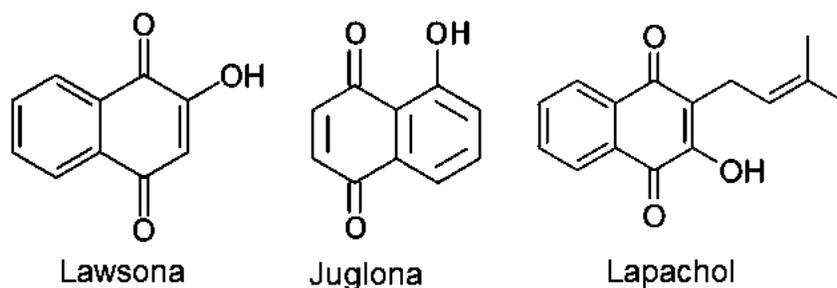
toronja), isoflavonoides (genisteína y daidzaína presentes en soya y sus derivados). Protoantocianidinas en semillas de uva y vino tinto (Coronado, *et al.* 2015).

En las plantas se sintetiza un gran número de compuestos secundarios que proveen un reservorio para la generación de agentes activos farmacéuticos. Algunas de las funciones ecológicas de los metabolitos secundarios: sirven a las plantas para su adaptación al ambiente y su interrelación con otros organismos; sirven de protección contra la luz UV, el ozono, los herbívoros y contra microorganismos patógenos. Los roles defensivos de los metabolitos secundarios han sido confirmados experimentalmente por el uso de métodos moleculares modernos (Barrales, *et al.* 2012).

En varias especies de árboles se aislaron metabolitos secundarios con actividad terapéutica importante como: En la corteza del *Taxus brevifolia* conocido como tejo, se aisló e identificó al paclitaxel utilizado como tratamiento para el cáncer de mama y en combinación con cisplatino para el tratamiento de cáncer de ovario (Centelles, *et al.* 2010). Por otro lado, se han encontrado actividades antioxidante, antifúngica, insecticida, antibacteriana y toxicidad *in vivo* en el modelo de *A. salina* (ver Cuadro 1).

Por otro lado, en el bosque de la región de Valona de Bélgica se evaluaron 48 extractos de 16 árboles para analizar y evaluar una actividad inhibidora del crecimiento *in vitro* contra el cáncer de colon LoVo humano, el cáncer de próstata PC3 y las líneas celulares de glioblastoma U373. Las especies que presentaron una potente actividad inhibitoria del crecimiento *in vitro* de las células cancerígenas: *Alnus glutinosa*, *Carpinus betulus*, *Castanea sativa*, *Fagus sylvatica*, *Ilex aquifolium*, *Larix decidua*, *Quercus petraea*, *Quercus robur*. En las especies de los géneros *Plumbago* (*Plumbaginaceae*), *Drosera* (*Droseraceae*) y *Diospyros* (*Ebenaceae*) se aisló de tejido de corteza, hoja y raíz la plumbagina (2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona) a la que se le atribuye efectos terapéuticos como antiespasmódica, antibacteriana, antifúngica antiparasitaria y anticancerígena (López, *et al.* 2011).

Además, en la corteza y madera de los géneros de *Tabebuia sp.* y *Tecoma sp.* se encuentra el lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona), con actividades antitumorales, antibacterianas, antimaláricas y antifúngicas (López, *et al.* 2011). Por otra parte, en las hojas y cáscara del fruto del nogal (*Juglans regia L.*, *Juglandaceae*) se aisló e identificó a la juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona), la cual es utilizada para teñir a la madera debido a su tono marrón además le confiere protección contra organismos saprofitos (Fig. 4) (López, *et al.* 2011).



**Figura 4** Estructura química de las naftoquinonas naturales.

Por otro lado, se utilizan alcaloides como la camptotecina, aislada de la especie *Camptotheca acuminata* (*Cornaceae*) y la homoharringtonina, aislada del árbol de hoja perenne *Cephalotaxus harringtonia* (*Cephalotaxaceae*) originario de Japón, para el tratamiento de del cáncer de mama, testículo, pulmón y leucemia (Muñoz, *et al.* 2015). De igual manera, de las hojas de *Camptotheca* lograron extraer a la camptotecina es monoterpene alcaloide de quinolina pentacíclico específico para interferir en la fase S del ciclo celular de las células neoplásicas (Isah, *et al.* 2016). Así mismo, aislaron a la rohitukina a partir de hojas y tallos de *Amoora rohituka*. Presento muchos efectos terapéuticos como antiinflamatorio e inmunomoduladores, inhibición de la adipogénesis *in vitro* y detención de la expansión clonal mitótica con dislipidemia *in vivo*. Además, mostró toxicidad a un nivel moderado frente a la leucemia promielocítica humana HL-60 y células de cáncer de colon HCT-166 (Isah, *et al.* 2016).

Por otra parte, la harringtonina y la cefalotaxina se aislaron por primera vez de *Cephalotaxus harringtonia* y otros miembros del género. La harringtonina y los ésteres (harringtonina, homoharringtonina, isoharringtonina y desoxiharringtonina) presentan un efecto antileucémico, en líneas celulares de ratón P-388 y L-1210. Además, los científicos chinos identificaron que la harringtonina funciona como agente antineoplásico para el tratamiento de la leucemia mielógena aguda, el síndrome mielodisplásico y la leucemia promielocítica aguda (Isah, *et al.* 2016).

Por otro lado, Pant, *et al.* (2017) revelaron que *P. marsupium* es una fuente de diversos fitoconstituyentes, tales como alcaloides, glucósidos, saponinas, taninos, proteínas, carbohidratos, glucósidos cardíacos, flavonoides y terpenoides. Elaboraron tres extractos de la madera de vástago de *P. marsupium*, uno de acetona, otro de alcohol isopropílico (IPA) y el último fue etanólico. Los tres extractos exhibieron una actividad antioxidante dosis-dependiente. Además, el extracto de acetona y el extracto de IPA mostraron actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas, mientras que el extracto etanólico se encontró que poseía actividad antidiabética. Se encontró que la actividad antidiabética del extracto era dependiente

de la dosis-tiempo. De forma similar, se encontró que el extracto de acetona y el extracto de IPA tenían actividad antiinflamatoria, que también era dependiente del tiempo y de la dosis. Además, el extracto etanólico mostró actividad analgésica, que fue dependiente de la dosis. Y por último, encontraron que el extracto etanólico no era tóxico, revelando que los extractos de madera de vástago de *P. marsupium* poseen actividades antibacterianas, antidiabéticas, antiinflamatorias y analgésicas.

Pradeepkumar, *et al.* (2017) evaluaron la actividad antiulcerosa del extracto metanólico de las hojas de *Peltophorum pterocarpum* (MEPP). Encontraron que el extracto metanólico contenía fenoles, flavonoides y taninos con potencial actividad antioxidante y citoprotectora. Además, utilizaron ratas albinas, para determinar la actividad antiulcerosa del extracto, se evaluaron el índice de úlcera media, la acidez libre y la acidez total. Como resultados el índice de úlcera disminuyó significativamente a  $p < 0,01$  en los grupos tratados con MEPP en comparación con el grupo de control. La acidez total y libre disminuyó significativamente a  $p < 0,01$  en los grupos tratados con MEPP en comparación con el grupo control. El análisis histológico también apoyó el efecto gastro-protector de los grupos tratados con MEPP en comparación con los grupos control, revelando que MEPP exhibió potencial antiulceroso dosis-dependiente y citoprotector.

Por otro lado, Salem, *et al.* (2017) recopilaron información acerca de *Callistemon viminalis* un arbusto de la familia Myrtaceae reportando tener varios valores medicinales tales como antibacterianos, antifúngicos, actividades antioxidantes y otras propiedades farmacéuticas e insecticidas. (Ninomiya, *et al.* 2017) desarrollaron un método práctico para la determinación cuantitativa simultánea de 13 estilbenoides, esperapenol, isoforapenol, hemsleyanol D, ampelopsina H, vaticanoles A, E y G,  $\alpha$ -viniferina, pauciflorol A, hopeafuran, balanocarpol y trans-resveratrol 10-C- $\beta$ -D-glucopiranosido, y dos dihidroisocumarinas en la corteza y partes de madera de *Shorea roxburghii* y *Cotylelobium Melanoxylon*. El método fue validado con respecto a linealidad, límite de detección y precisión los polifenoles mostraron efectos protectores contra la lesión hepática inducida por D-GalN / LPS en ratones.

Nayak, *et al.* (2017) describieron un método eficiente para el proceso de aislamiento y purificación de oxiresveratrol de la madera de *A. hirsutus* ésta especie es buscada en la medicina tradicional por ser eficaz para el tratamiento de úlceras, diarreas y espinillas. Encontraron que el compuesto aislado posee una potente actividad antioxidante, antiinflamatoria y de inhibición de la melanogénesis utilizando células de melanoma murino. Dejando claro que la especie *A. hirsutus* es una nueva fuente alternativa para aislar el

oxiresveratrol, que puede encontrar aplicación en formulaciones de aclaramiento y/o blanqueamiento de la piel.

Hepper, *et al.* (2017) identificaron los grupos fitoquímicos de extracto metanólico foliar de *Celtis toka* para evaluar el contenido en fenoles de los extractos y su actividad antioxidante. Las cumarinas, flavonoides, mucílagos, triterpenoides y esteroides fueron los principales constituyentes fitoquímicos del extracto foliar, el extracto de etanólico y sus fracciones eran activos en los 4 métodos antioxidantes. En el ensayo ABTS<sup>+</sup>, el extracto de etanol fue más activo que sus tres fracciones, mientras que en el ensayo de óxido nítrico dicho extracto tuvo un efecto similar al de la fracción más activa (fracción acuosa) encontraron que las fracciones de acetato de etilo y cloroformo eran más activas en los ensayos DPPH y FRAP.

Tavčar, *et al.* (2017) caracterizaron proantocianidinas y midieron la bioactividad de los extractos de hojas, corteza y madera de *Uncaria tomentosa* con un rico y diverso contenido de compuestos oligoméricos de procianidina y propelargonidina en los extractos estudiados, así como una importante actividad antioxidante; citotoxicidad frente a líneas celulares de cáncer gástrico y de colon con selectividad con respecto a células vero normales; y efecto antimicrobiano contra los patógenos respiratorios *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estos hallazgos sugieren el valor potencial de *U. tomentosa* especialmente en hojas y corteza, de los extractos polifenólicos con uso prospectivo como ingredientes funcionales.

Zhang, *et al.* (2017) elaboraron un estudio sobre el aislamiento, propiedades fisicoquímicas y actividad antioxidante *in vitro* de polisacáridos extraídos de los conos, corteza y agujas de *Pinus koraiensis* encontrando que estas muestras contenían ácido urónico, determinaron que las relaciones entre las propiedades antioxidantes *in vitro* de los polisacáridos extraídos de diferentes partes del árbol de *P. koraiensis* se correlacionan con propiedades fisicoquímicas (la cantidad de azúcares neutros, ácido urónico y proteínas). Además, los polisacáridos de la piña confirmaron la capacidad antioxidante beneficiosa y potencial reductor teniendo la mejor actividad antioxidante de las 3 partes.

Los extractos de lignina de la madera de *Acacia nilotica* tienen un potencial notable para prevenir las enfermedades causadas por la sobreproducción de radicales y también parecen ser un candidato prometedor como antioxidantes naturales y agentes anticancerígenos (Barapatre, *et al.* 2016).

El árbol *Eysenhardtia polystachya*, perteneciente a la familia *Leguminosae*, se conoce como "palo azul" y tiene un amplio uso para el tratamiento de la nefrolitiasis, como un trastorno depurativo de la sangre, diurético y antirreumático y de la vejiga que se desarrolla durante la diabetes, los estudios fitoquímicos indican que contiene polifenoles (Gutiérrez *et al.* 2014).

El género *Pinus* pertenece a la familia *Pinaceae* y comprende alrededor de 250 especies. Es el género más grande de coníferas que se encuentra naturalmente en el hemisferio norte, especialmente en la región del Mediterráneo, el área del Caribe, Asia, Europa, América del Norte y América Central. Las propiedades medicinales y aromáticas de los compuestos químicos (trementina, resinas y aceites esenciales) del pino lo convierten en una de las plantas más populares de toda la civilización. El pino también se usa ampliamente en la práctica terapéutica tradicional en el mundo y tiene importancia económica los compuestos secundarios (terpenoides y compuestos fenólicos) pueden afectar los simbiontes radiculares y la calidad del sitio, al interferir con la descomposición, mineralización y humificación (Fekih, *et al.* 2014).

### **3.4 *Eysenhardtia polystachya***

*Eysenhardtia polystachya* conocido comúnmente como "Palo dulce", es un árbol que pertenece a la familia *Fabaceae*, es un arbusto caducifolio, de 3 a 6 m (hasta 9 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de 15 cm o más. Sus hojas son alternas, compuestas, pinnadas, 3 a 5 cm de largo, folíolos 10 a 15 pares por hoja, elípticos, 7 a 13 mm de largo por 3 a 5 mm de ancho, con glándulas resinosas aromáticas presentes en el tronco y ramas, sus tallos son ramificados y de color café oscuro. La corteza externa es de color amarilla de textura ligeramente rugosa, escamosa cuando seca desprendible en placas irregulares de color oscuro de 1 mm de grosor, la corteza interna es de color pardo-rojiza. Sus inflorescencias están dispuestas en racimos espigados terminales o subterminales, 5 a 7 cm de largo; cáliz campanulado, 2.5 a 3 mm de largo, lobulados; corola blanca, formada por 5 pétalos libres, de 5 mm de largo por 1.3 a 2 mm de ancho, oblongos. El fruto es en forma de vaina ligeramente curvada, atenuada en el ápice, pubescente o subglabra, de 7 a 9.5 mm de largo, con el estilo persistente, frágil e indehiscente, provista con glándulas; cada vaina contiene una semilla. En las semillas la testa es delgada y permeable al agua. Su follaje es caducifolio, florece de mayo a octubre, fructifica de noviembre a diciembre y es hermafrodita (Fig. 5) (Sargent, 1892).

Es ampliamente distribuida en ambas vertientes y en la parte central del país. Altitud: 150 a 3,000 m. En los estados de Colima, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Guerrero,

Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Sargent, 1892).

Hábitat: es abundante en zonas semicálidas, con temperaturas entre 12 y 19 °C y una precipitación anual de 300 a 1,800 mm. Prospera en lugares perturbados, así como en terrenos pedregosos y de suelo somero, negro profundo, delgado arcilloso pedregoso, somero de roca caliza, litosol derivado de basalto, amarillo derivado de conglomerado, roca ígnea. Es una especie que se presenta en vegetación secundaria de selva baja caducifolia, árida y semiárida, trópico húmedo, templada húmeda, templada subhúmeda y trópico subhúmedo (Sargent, 1892).

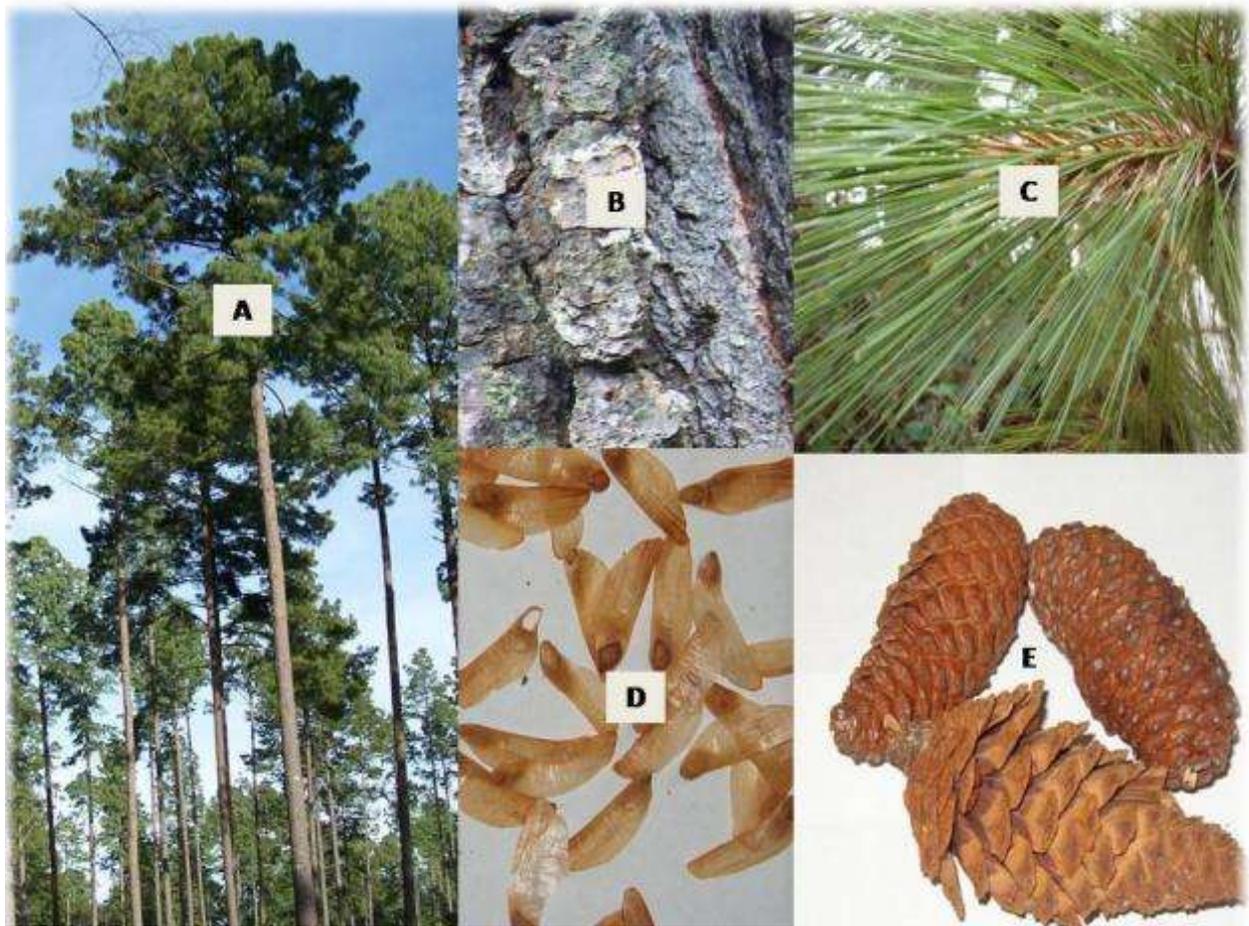
Usos: se le da uso combustible a la madera muy usada para leña con buenas características energéticas, también es de uso forrajero el tallo joven y la hoja, proporciona forraje en abundancia para el ganado bovino y caprino. En el uso medicinal se usa madera con fines diuréticos, se prepara una infusión a la que se le atribuyen propiedades contra enfermedades renales y de la vesícula. También se utiliza para elaborar copas y vasijas (Sargent, 1892).



**Figura 5** A) Muestra la descripción botánica de las ramas de *E. polystachya* de acuerdo con Sargent, (1892) y B) Árbol maduro de *Eysenhardtia polystachya* creciendo en condiciones naturales.

### ***3.5 Pinus pseudostrabus***

*Pinus pseudostrabus*, se le conoce como pachingo y mocohtaj (lengua tojolobal), pino ortiguillo, pino blanco, pino triste, ocote, pino canís y pino real. Es perteneciente a la familia *Pinacea* del género *Pinus*, árbol siempre verde de 25 a 40 m de altura, de 40 a 80 cm en diámetro normal, fuste recto, presenta buena poda natural con el 30 a 50% de su altura total libre de ramas. La corteza es lisa durante mucho tiempo y en la vejez es áspera y agrietada. Las hojas se encuentran en grupos de 5, de 17 a 24 cm de longitud, muy delgadas, triangulares y flexibles, de color verde intenso, a veces con tinte amarillento o glauco, finamente aserradas con los dienteccillos uniformes. Por lo general cuenta con 3 ó 2 canales resiníferos en la parte media, rara vez con uno interno o externo. Las vainas son persistentes, anilladas de 12 a 15 mm (a veces hasta 20), de color castaño oscuro, algo brillantes; yemas oblongo cónicas de color anaranjado, conillos oblongos largamente pedunculados, oscuros, con gruesas escamas provistas de puntas romas. Las ramas son extendidas y verticiladas, ramillas delgadas y frágiles, con largos entrenudos, con tinte azulado en las partes tiernas, las bases de las brácteas son espaciadas y frecuentemente adheridas a las ramillas y como sumergidas a ellas. Los conillos son oblongos largamente pedunculados, oscuros, con gruesas escamas provistas de puntas romas. Los conos son ovoides o largamente ovoides de 8 a 10 cm, a veces más, de color café claro, amarillento o moreno, extendidos, muy levemente encorvados, un poco asimétricos, generalmente en pares; sobre pedúnculo de 10-15 mm de longitud, no se desprende con el cono y con frecuencia queda en la ramilla con algunas escamas basales. Las escamas son delgadas pero duras, desiguales, de 3 a 3.5 cm de largo por 1.5 a 1.8 de ancho, con ápice anguloso; umbo irregularmente cuadrangular; quilla transversal por lo común baja y poco marcada; costilla perpendicular poco visible; apófisis aplanada, en ocasiones saliente y redondeada, cúspide pequeña, deprimida, provista de una punta cónica, frágil y persistente. La semilla es vagamente triangular, de color oscuro, de unos 6 mm y ala de 23 mm de largo por 6 a 9 mm de ancho (Fig. 6) (Martínez, 1948).



**Figura 6** A) Muestra la fotografía del árbol y ramas, B) Corteza, C) Hojas, D) Semillas y E) Conos de *Pinus pseudostrobus* en condiciones naturales.

Distribución y hábitat: se reporta como originaria de México, Guatemala y Honduras; en general en latitudes que van de 14° norte a 26° norte. En la República Mexicana su distribución queda comprendida entre los paralelos 17° 15' a 29° 25' de latitud norte y los meridianos 92° 05' a 108° 35' de longitud oeste. Se localiza en la Sierra Madre Oriental, Eje Neovolcánico y en la Sierra Madre del Sur, Sierra Madre de Chiapas y parte de la Sierra Madre Occidental. Se ha registrado en las siguientes entidades federativas: Jalisco, Colima, Estado de México, Hidalgo, Distrito Federal, Puebla, Guerrero, Morelos, Oaxaca, Coahuila, Chihuahua, Guanajuato, Chiapas, Puebla, Querétaro, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz y Tlaxcala. En Michoacán se reporta en los municipios de Acuitzio, Uruapan, Madero, Zacapu, Zinapécuaro, Zitácuaro, Coalcomán, Aguililla, Charo, Cherán, Erongarícuaro, Ciudad Hidalgo, Indaparapeo, Angangueo, Morelia, Nahuatzen, Nuevo Parangaricutiro, Ocampo, Paracho, Pátzcuaro,

Quiroga, Los Reyes, Salvador Escalante, Senguio, Tacámbaro, Tancítaro, Tangamandapio, Tingambato, Tuxpan y Tuzantla (SEMARNAP, 2006).

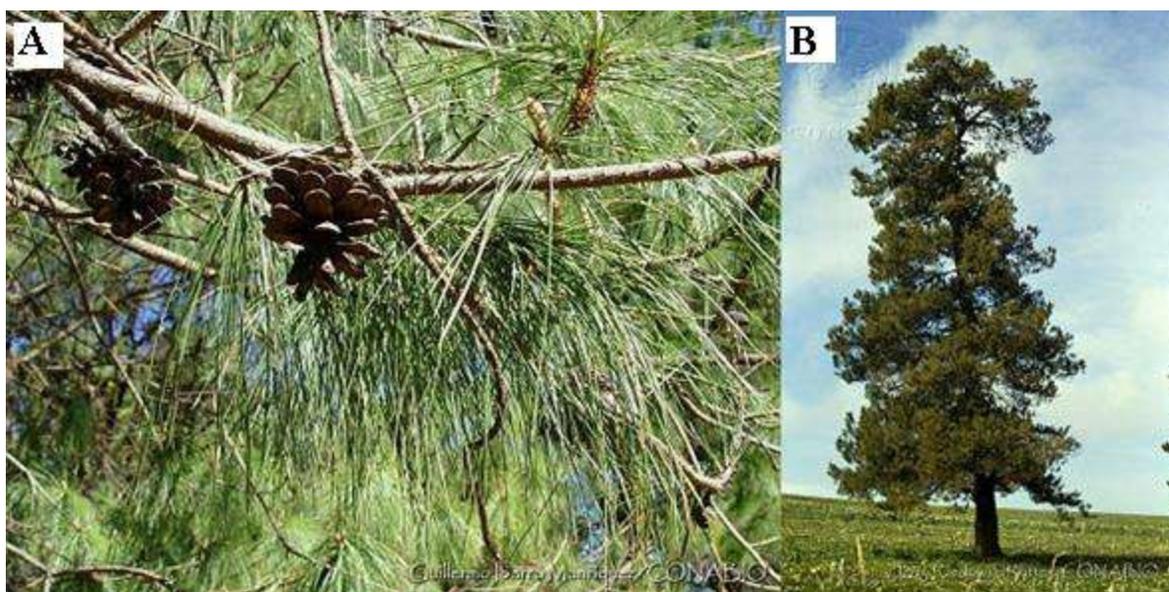
Usos: esta especie es buena productora de resina, la cual es explotada en los estados del centro y sur de México. La madera es de buena calidad y sus largos fustes limpios permiten el uso en aserrío, madera terciada, chapa, triplay, pulpa para papel, caballetes, molduras, jaulas y envases, como barrera de calor y sonido, postes, pilotes, madera para minas, durmientes para ferrocarril, tejamaniles y largueros, combustibles, palillos y fósforos. Asimismo, es muy apreciada en artesanías, ebanistería y muebles finos o de producción seriada, como mesas, butacas, bancos, etc., en las zonas rurales tiene varios usos domésticos. También se propone emplearlo en la fabricación de abatelenguas, palos para paleta, cucharas para nieve, pisos, cancelas, tarimas y plataformas, etc. Es una especie recomendable para plantaciones comerciales, también para su uso ornamental en campos deportivos y parques, debido a que su follaje semicolgante desprende un aroma agradable a resina (Eguiluz, 1978).

### ***3.6 Pinus leiophylla***

*P. leiophylla* se conoce comúnmente como Manzanita, Ocote, Ocote chino, de ocoshal delgado, negro, Palo otomite, Pino, Pino blanco, chamonque, chimonque, chino, negro, prieto, calocote, saguaco, chamaite, chico, otomite Sawá Tarahumara; Sawá Rarámuri, Tlacocote, Xalatlaco. Crece hasta una altura de 20-30 m, con un diámetro de tronco de 35 a 80 cm. Las agujas crecen en unidades de tres a cinco, entre 5-10 cm (raramente hasta 15 cm) de largo y son de un verde brillante hasta verde amarillento. Los conos son ovoides, de 4-7 cm (raramente 8 cm) de largo, y nacen de un tallo de 1-2 cm de largo. Necesitan alrededor de 30 a 32 meses para madurar, es decir, un año más que la mayoría de los demás pinos. La corteza es de color gris-marrón, y con fisuras (Fig. 7).

Tiene una amplia distribución, principalmente en México, con una pequeña extensión en los Estados Unidos en el sureste de Arizona y el suroeste de Nuevo México. Su distribución en México se extiende a lo largo de la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre del Sur; de Chihuahua hasta Oaxaca, entre 1,600 y 3,000 msnm. Requiere de una precipitación anual de 600 a 1,000 mm, sobre todo en el verano. Tolerancia las heladas en el invierno y en verano comúnmente. Fue introducida en explotaciones comerciales en Australia y en diferentes países en África, incluyendo Kenia, Malawi, Sudáfrica, Zimbabue, Zambia. En Sudáfrica y Queensland (Australia) en donde hay grandes extensiones de siembras de este árbol.

Usos: la madera de *P. leiophylla* es dura, densa y fuerte, es utilizada para la construcción, para fabricar los durmientes del ferrocarril. El uso más común de esta especie es contra la tos en los estados de México y Tlaxcala; se bebe un té de corteza del árbol, como expectorante, se usa contra la bronquitis aguda, interviene además en el tratamiento de reumas, dermatitis, en la cicatrización de heridas y se usa como antiséptico de las vías urinarias y como diurético. Fue descrita por Schiede ex Schltdl. y Cham, publicado en *Linnaea* (Conabio, 2018).

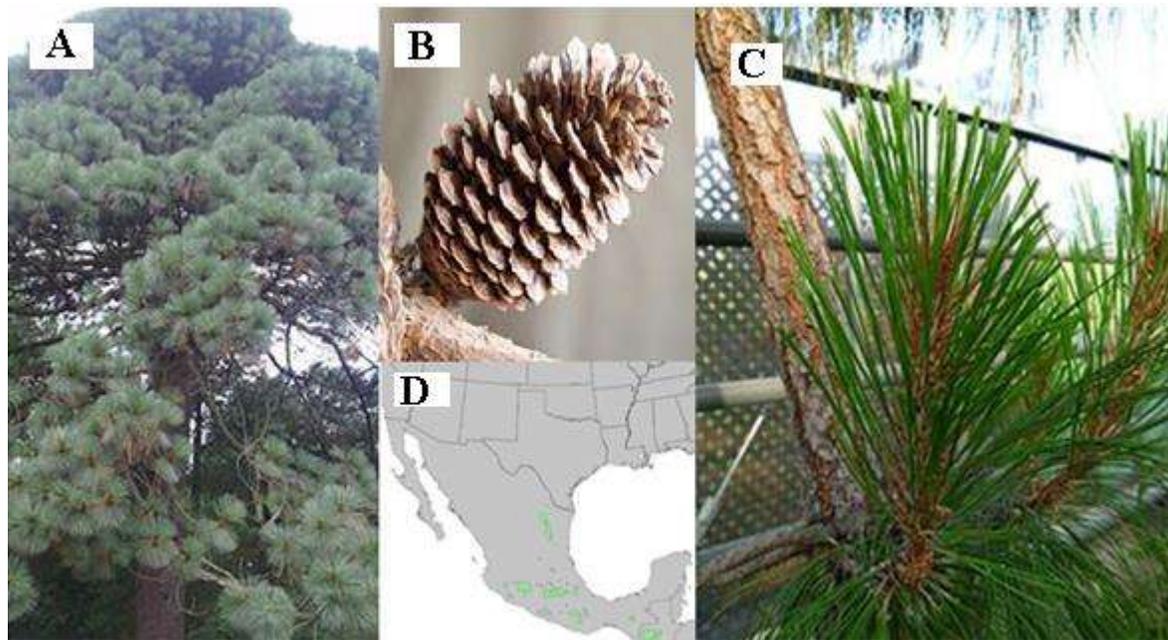


**Figura 7** A) Fotografía que muestra las estructuras anatómicas de Conos, ramas y B) Árbol de *Pinus leiophylla* en condiciones de crecimiento naturales.

### ***3.7 Pinus montezumae***

*Pinus montezumae* se conoce comúnmente con los nombres de Juncia, Ocote, Ocote blanco, Ocote escobetón, Pino, Pino blanco, Pino chamaite, Pino colorado, Pino de vara gruesa, Pino gordo, Pino lacio, Pino moctezuma, Pino ocochamate, Pino real, Chalmaite, Chalmaite blanco, Ocochamate, Ocote escobetó, Ocote toma agua, Pino chalmaite blanco, Yutnu-satnu. Esta conífera desprende una resina aromática que arde con facilidad cuando entra en contacto con el fuego debido a su resina inflamable. En algunos lugares su madera se utiliza para la construcción y también como combustible. Es un árbol con una altura de entre 20 y 35 m, y tronco hasta 80 cm de diámetro; sus hojas forman generalmente grupos de cinco, de color verde oscuro, la corteza de este árbol es de una tonalidad café rojizo (Fig. 8). Su madera es blanca y resinosa. Crece en bosques de pino y encino en lugares entre los 1,400 y 3,200 msnm, con lluvias entre 900 y 1,600 mm y con una temperatura media anual de 11 a 18 °C, por lo que se puede encontrar en las

zonas boscosas de las montañas de México, Guatemala y zonas norte de El Salvador. Las ciudades de Ocotlán en Jalisco, Ocotlán de Morelos en Oaxaca. Fue descrita por Aylmer Bourke Lambert y publicado en A Description of the Genus Pinus (Conabio, 2018).



**Figura 8** A) Imagen que muestra el árbol maduro de *P. Montezumae* creciendo en condiciones naturales, B) Estructura anatómica llamada cono, C) Distribución geográfica de la especie de *P. Montezumae* en México, y D) Ramas de *P. Montezumae*.

#### **4. Justificación**

La mayoría de los estudios realizados al día de hoy sobre la naturaleza de compuestos, se orientan en aislar e identificar los extraíbles de la madera, provenientes de la corteza, albura o duramen, dejando en segundo plano el efecto que dichos compuestos pueden llegar a tener en modelos biológicos con enfoque ya sea biotecnológico o médico, por otra parte las plantas son las principales fuentes de compuestos terapéuticos de las cuales se aísla de las hojas, flores y raíces, dejando de lado la madera. Por esta razón, en el presente trabajo se plantea la idea de evaluar el efecto de diversos extractos provenientes de *Eysenhardtia polystachya*, *Pinus leiophylla*, *Pinus montezumae* y *Pinus pseudostrobus* para medir su efecto biológico y antioxidante.

## 5. Objetivos

### Objetivo General

Evaluar la actividad biológica de los extraíbles de madera de *E. polystachya*, y corteza de *P. leiophyla*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*.

### Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extraíbles de *E. polystachya*, *P. leiophyla*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*.
- Analizar la acción insecticida de los extraíbles de *E. polystachya*, *P. leiophyla*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*.
- Determinar la actividad antioxidante y citotóxica *in vivo* de los extraíbles de *E. polystachya*, *P. leiophyla*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*.
- Analizar el efecto antimicrobiano de los extraíbles de madera de *E. polystachya*, *P. leiophyla*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*.

## **6. Materiales y Métodos**

### **6.1 Material biológico**

#### **6.1.1 Material vegetal**

El material para la elaboración de los extractos a partir de la especie arbórea *Eysenhardtia polystachya* (Palo dulce) utilizados en este estudio fueron donados por el laboratorio de Química del IIQB a cargo del D.C Rafael Herrera Bucio profesor investigador miembro del Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera.

La corteza de madera de las especies de *Pinus*; *P. pseudostrabus*, *P. leiophylla* y *P. montezumae* utilizadas en este estudio, fueron donadas por el laboratorio de Química de la Madera a cargo del D.C José Guadalupe Rutiaga Quiñones profesor investigador miembro del Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera.

Las cepas fúngicas (*Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum*) que se utilizaron en el presente estudio son pertenecientes a la colección del laboratorio de Microbiología de la Madera del Edificio de Posgrado de FITECMA a cargo del Dr. Crisanto Velázquez Becerra profesor investigador miembro del Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera.

Las cepas bacterianas (*Ralstonia picketti*, *Campylobacter jejuni*, *Micrococcus luteus* y *Kocuria palustris*) utilizadas para los ensayos antibacterianos, nematodos *Caenorhabditis elegans* y crustáceos *Artemia salina* requeridos para los bioensayos *in vivo*, se analizaron en el laboratorio de Biología Sintética del Centro de Innovación y Desarrollo Agroalimentario de Michoacán A.C. (CIDAM) a cargo del D.C Josué Altamirano Hernández profesor investigador a cargo del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Experimental.

#### **6.1.2 Obtención de los extractos**

El material vegetal (astillas) se colocó en un desecador con aireación por un periodo de 5 días a 45 °C, una vez seco se molió en un molino industrial obteniendo un polvo fino (aserrín). Para la obtención de los extractos acetónico (AC), tetrahidrofuranólico (THF), metanólico (MET) y acuoso (WA) se pesaron en una balanza analítica, 30 g de material vegetal seco triturado que se colocó en un dedal de extracción de

celulosa Soxhlet y se adicionaron 300 mL de solvente (MEYER) grado reactivo en un matraz bola Erlenmeyer, se montó el equipo de extracción Soxhlet y se inició la extracción a temperatura de ebullición del solvente de 4-6 h, repitiendo el proceso tres veces utilizando la misma cantidad de solvente nuevo en cada ocasión. El extracto se concentró en un rotaevaporador para separar el solvente, el extracto crudo se llevó a sequedad completa en un desecador hasta sequedad total. Los extractos secos se almacenaron en frasco ámbar hasta su utilización. Para la evaluación del rendimiento de las extracciones con solventes en el proceso de soxhlet se utilizó la ecuación modificada de (Happel y Jordan, 1981).

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{(\text{peso inicial de la madera} - \text{peso final}) \times 100}{\text{extracto obtenido}}$$

## **6.2 Experimentos *in vitro***

### **6.2.1 Análisis fitoquímico preliminar para identificación parcial de metabolitos secundarios**

Para la determinación inicial de los principales principios activos presentes en los extractos de madera *E. polystachya*, *P. pseudostrobus*, *P. leiophylla* y *P. montezumae* se realizaron pruebas químicas de identificación. Las soluciones de los extractos se prepararon a diferentes concentraciones disueltos en diferentes solventes orgánicos. Se utilizaron diferentes métodos de cuantificación con el propósito de identificar compuestos fenólicos.

### **6.2.2 Extracción y cuantificación de fenoles**

Para la extracción de fenoles totales se colocó la muestra de las diferentes maderas en una solución de metanol al 50% adicionado con HCl al 1% con agitación constante por 3 días consecutivos con un cambio de solución cada 24 h. Las muestras se filtraron con papel filtro Whatman de tamaño del poro de 11 µm. La muestra se concentró en rotavapor hasta sequedad a una temperatura de 50°C para recuperarla en 3 mL de metanol al 50%. La determinación de fenoles totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu. El ácido gálico se empleó como estándar a una concentración de 0.010 a 5 mg/mL. Las absorbancias respectivas se midieron a 760 nm en un espectrofotómetro M491 EPOCH. La concentración de fenoles totales se reportó como mg de equivalentes de ácido gálico/mL. Los valores equivalentes a µmoles de

ácido gálico/g peso fresco de cada muestra se obtuvieron con la ecuación de la recta de la curva de linealidad. Curva de calibración (Anexos, Fig. 25).

$$y = (0.2771x) - 0.0659$$

$$x = \frac{y - 0.0659}{0.2771}$$

Dónde:

y = absorbancia obtenida

x =  $\mu$ moles de ácido gálico/g peso fresco

### **6.2.3 Determinación de la actividad antioxidante *in vitro***

Para determinar la actividad antioxidante los extractos se normalizaron a una concentración de 10  $\mu$ g/mL esto con el fin de evaluar la potencia antioxidante de los extractos en cada madera, para ello se utilizaron 3 métodos diferentes.

### **6.2.4 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de madera por el método de DPPH $\cdot$**

La actividad antioxidante de los extractos se evaluó en base a la capacidad de eliminar el radical libre 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH $\cdot$ ) en base al método descrito por (Brand-Williams *et al.* 1995), con modificaciones para adaptarlo a nuestras condiciones. Las soluciones de los extractos se mezclaron con 1,000  $\mu$ L de la solución metanólica de DPPH $\cdot$  1 mM. Las muestras se incubaron por 30 min a temperatura ambiente y la absorbencia se midió a 517 nm empleando un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 18. Las diferencias en absorbencia entre la muestra y el control (DPPH $\cdot$  en etanol) se calcularon y expresaron como miliequivalentes de ácido gálico o del radical DPPH $\cdot$ . Se emplearon soluciones de ácido gálico como estándares de referencia. Curva de calibración (ver Anexos, Fig. 26).

### **6.2.5 Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de madera por el método ABTS<sup>+</sup>**

La capacidad de atrapamiento de los radicales libres se evaluó por el método del radical ABTS<sup>+</sup> (Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) desarrollado por (Pellegrini, *et al.* 1999), indicado para emplearse con compuestos coloridos como los extractos de este estudio, adaptado a la metodología descrita por (Kuskoski, *et al.* 2004), con modificaciones. Para la preparación del radical ABTS<sup>+</sup>, se harán reaccionar persulfato de potasio (2.45 mM) con ABTS<sup>+</sup> (7mM). La mezcla se cubrió completamente y se dejó en agitación por al menos 16 h a temperatura ambiente para permitir la formación del radical. Transcurrido este tiempo, 150 µL del radical ABTS<sup>+</sup> se diluyó con 15 ml de etanol absoluto en un vaso cubierto con papel aluminio, para obtener una absorbencia de 0.7±0.02, se registró la absorbencia inicial y en la misma celda se añadió 10 µL del extracto a probar diluido en etanol absoluto. La mezcla se agitó cuidadosamente y se comenzó a leer la absorbencia a 754 nm empleando un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 18, se tomaron lecturas a 1 min y 6 min después de iniciar la reacción. Se realizó una curva estándar con TROLOX disuelto en etanol (10 mM) con el mismo procedimiento para muestras y estándares. Los resultados se expresaron como CAET (capacidad antioxidante equivalente a TROLOX) Curva de calibración (Anexos, Fig. 27).

### **6.2.6 Evaluación del poder antioxidante reductor de Hierro (FRAP)**

En el ensayo FRAP (por sus siglas en inglés “Ferric Reducing Antioxidant Power”) los compuestos antioxidantes reducen el complejo Fe (III)-Tripiridiltriazina en su forma ferrosa de color violeta que ha sido descrito previamente por (Benzie y Strain, 1996). Para este ensayo se elaboró la solución de trabajo el día del ensayo para la cual se mezcló Acetato de Sodio 300 mM a pH de 3.6, Cloruro Férrico 20 mM y TPTz (2, 4,6-tripiridil-s-triazina) 10 Mm (SIGMA) en proporción 10:1:1 y se colocó en agitación a 37° C por 10 minutos en obscuridad. Para el ensayo se colocó 10 µL de cada extracto normalizado y 150 µL de la solución de trabajo en placas de 96 pozos y se dejó estabilizar la reacción por 20 minutos en ausencia de luz. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 593 nm en un espectrómetro UV-Vis para microplacas (Epoch, BioTek, USA). Para ver la correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante *in vitro* se multiplicó el valor obtenido a una concentración de 10 µg/mL de compuestos fenólicos por la cantidad total contenida en el extracto crudo Curva de calibración (Anexos, Fig. 28).

### 6.3 Actividad insecticida de los extractos de corteza de *Pinus* y madera de *E. polystachya* mediante el cálculo de la DL<sub>50</sub> en el modelo biológico de *Anopheles aegypti*

*A. aegypti* se usó para éste estudio, en el estadio de 4 a 10 días (Fig. 9) que es la edad temprana larvaria del mosquito se utilizó en este trabajo debido a que es el transmisor de enfermedades por picadura del mismo como dengue, chinkonkunya y zica que han sido detectadas en gran parte del área de tierra caliente y la zona costera, donde las condiciones de humedad le permiten reproducirse afectando a la población, por lo que el gobierno recurre a medidas de fumigación que no solo dañan a este mosquito si no a la fauna acuática benigna por lo cual es necesario emplear un biopesticida con un menor impacto ambiental. Para montar éste experimento se colocaron 6 larvas por pocillo las cuales se obtuvieron a partir del crecimiento natural en envases de plástico y clasificadas, posteriormente se colocaron los extractos a las concentraciones de 10, 50, y 100 µg/mL, de 12 y 24 horas para calcular la DL<sub>50</sub> determinando la inmovilidad de dicha larva como muerte por la observación de la misma en una lupa estereoscópica. Para medir el efecto insecticida se obtuvo por medio de regresión lineal la ecuación de la recta R<sup>2</sup> a partir del cálculo del coeficiente de correlación de Pearson:

$$r = \frac{\Sigma(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\Sigma(x - \bar{x})^2 \Sigma(y - \bar{y})^2}}$$

Coficiente de R<sup>2</sup> (conocido  $\bar{y}$ , conocido  $\bar{x}$ )

Conocido  $\bar{y}$  : Rango % supervivencia

Conocido  $\bar{x}$  : Rango concentración



**Figura 9** Fotografía que ilustra la morfología típica de la larva de 3<sup>er</sup> estadio de *A. aegypti*. La flecha roja indica la presencia de la larva en DMSO al 1%. 2x.

#### **6.4 Efecto tóxico de extractos de corteza de *Pinus* y madera de *E. polystachya* por medio del cálculo de la concentración letal 50 en el modelo *A. salina***

Los ensayos de citotoxicidad regularmente son costosos, requieren disciplina, equipo sofisticado, recolección de sangre y personal de tiempo completo, lo que ha llevado a la búsqueda de métodos que sean igual de sensibles pero que disminuyan los costos, el tiempo y la cantidad de muestra utilizada. El ensayo de letalidad en artemia también conocido como BSLT por sus siglas en inglés (Brine Shrimp Lethality Test) resulta una opción a esto. Este método es ampliamente utilizado para la detección de compuestos bioactivos en extractos crudos de plantas, aunque también se le ha empleado para determinar la toxicidad de algunos extractos de plantas, determinación de metales pesados, pesticidas, aditivos para comidas y algunas drogas. BSLT ha incrementado su uso debido a los bajos costos, alta sensibilidad para la detección de compuestos citotóxicos y el uso de cantidades menores de muestras comparado con otros métodos, además de que las larvas de artemia que se emplean para este ensayo son muy similares con una célula de mamífero, es rápido, simple y barato, por el uso de pequeñas cantidades de material para cada prueba (Mirzaei, *et al.* 2013).

##### **6.4.1 Crecimiento de *Artemia salina***

Los quistes de *A. salina* se colocaron en agua salada (3% de sal san-Halita, especial para acuarios), a una temperatura de 25°C con una iluminación de aproximadamente 2000 lux en la superficie del agua y manteniendo una aireación constante que permitió mantener niveles de oxígeno por encima de 2 mg/L

(Sorgeloos, *et al.* 1986). Después de 72 h el cultivo de artemia se encontró en la fase de nauplio (Fig. 10), para su uso en las pruebas de toxicidad.



**Figura 10** Foto que ilustra la morfología de los nauplios de *A. salina*. La flecha roja indica la presencia del nauplio en DMSO 1%. 4x.

#### **6.4.2 Determinación de la concentración de los extractos crudos para BSLT**

El intervalo de concentraciones adecuadas de los extractos para realizar el BSLT se determinó en un intervalo de concentración de 10-80  $\mu\text{g/mL}$ . Los mejores resultados se obtuvieron a concentraciones de 30, 40, 50 y 70  $\mu\text{g/mL}$  en tiempos de 12 y 24 horas.

#### **6.4.3 Determinación de $DL_{50}$**

La dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ) se determinó con las artemias en fase de nauplio. Las larvas se colocaron en placas de 96 pocillos, 6 larvas por pozo, para cada extracto se utilizaron cuatro concentraciones (10, 20, 40 y 80  $\mu\text{g/mL}$ ). El agua salada absoluta y otro con un volumen de dimetilsulfóxido (DMSO) 1% se emplearon como controles, con la finalidad de descartar que el DMSO tuviera un efecto sobre el cálculo de la  $DL_{50}$ . La muerte de las larvas se determinó cada 12 horas por un período máximo de 24 horas. La  $DL_{50}$  se calculó por el método de regresión lineal seleccionando aquella  $R^2$  con valores mayores o iguales a 0.8 y que presentará el 100% de sobrevivencia para las concentraciones más bajas y el 0% de sobrevivencia para aquellas concentraciones más altas. Se determinó la  $DL_{50}$  por medio de regresión lineal la ecuación de la recta  $R^2$  a partir del cálculo del coeficiente de correlación de Pearson:

$$r = \frac{\Sigma(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\Sigma(x - \bar{x})^2 \Sigma(y - \bar{y})^2}}$$

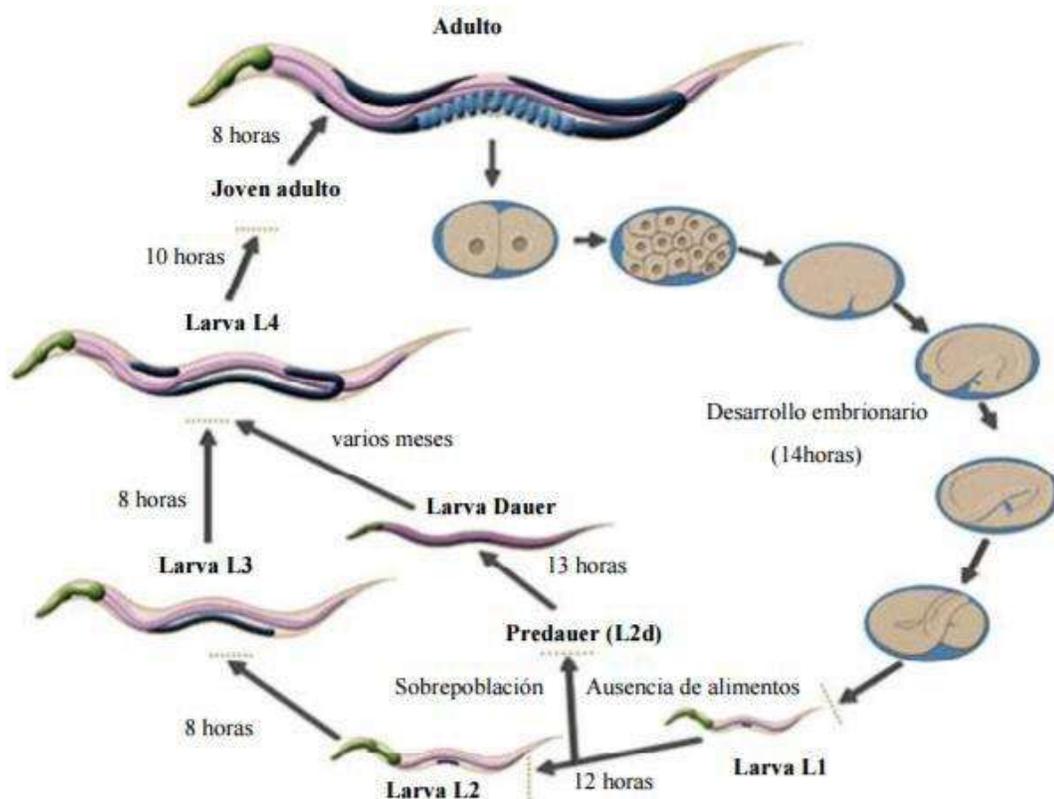
Coeficiente de  $R^2$  (conocido  $y^-$ , conocido  $x^-$ )

Conocido  $y^-$  : Rango % supervivencia

Conocido  $x^-$  : Rango concentración

### 6.5 Actividad antioxidante *in vivo*

Como modelo biológico para evaluar la actividad antioxidante *in vivo* se utilizó al nematodo *Caenorhabditis elegans* N2 por ser un modelo muy manejable en laboratorio, ciclo de vida corto y en el cual se pueden observar los efectos de un estrés oxidativo. Es un organismo hermafrodita que se alimenta de la bacteria *Escherichia coli* y tiene un ciclo de vida de 2 a 3 semanas. En etapa adulta mide 1 mm aproximadamente y es capaz de colocar entre 200 y 300 huevos a lo largo de su vida, al eclosionar, el nematodo pasa por cuatro estados larvarios antes de llegar a la etapa adulta. Durante su segundo estado larvario (L2) y en caso de sobrepoblación o ausencia de alimento, *C. elegans* N2 puede entrar a un estadio alternativo con mayor resistente al medio y al envejecimiento. A partir del cuarto estado larvario (L4) son capaces de producir espermatozoos y en etapa adulta pueden generar huevos (Fig. 11) (Priess y Hirsh, 1986). *C. elegans* N2 se utiliza comúnmente como modelo para diversos estudios de enfermedades como diabetes, obesidad o el envejecimiento prematuro (Moreno, *et al.* 2014). En el caso de diabetes la vía de señalización de la insulina en este nematodo es similar a la humana y regula tanto el metabolismo como el desarrollo y la longevidad. Schlotterer, *et al.* (2009) reportan que una concentración de 40 mM de glucosa en *C. elegans* N2 es equivalente a la concentración de glucosa en sangre de un paciente diabético y acorta el ciclo de vida del nematodo al igual que se reduce la expectativa de vida en personas con diabetes.



**Figura 11** Ciclo de vida del nematodo *C. elegans* (Worm Atlas, 2018).

### 6.5.1 Estrés oxidativo causado con Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ )

Los extractos de corteza de *Pinus* y madera de *E. polystachya* se normalizaron a concentraciones de 10 a 80  $\mu\text{g/mL}$  de compuestos fenólicos con medio M9. *C. elegans* N2 (WT) fue cultivado en medio de crecimiento de nematodos (NGM) (Anexo E1) en caja de Petri con *E. coli* OP50 en la superficie del medio a una temperatura de  $18^\circ\text{C}$ . Para el ensayo de actividad antioxidante se colocó *C. elegans* (en etapa adulta) en placa de 96 pozos con medio M9 (Anexo E2) en presencia del extracto normalizado y se dejó incubar la placa por 48 horas en oscuridad a  $18^\circ\text{C}$ , transcurrido ese tiempo se realizaron lavados con medio M9 y se agregaron concentraciones de 5, 10 y 15 mM de  $H_2O_2$  para causar un estrés oxidativo.

Se realizó un conteo de nematodos cada hora por un tiempo total de 6 horas y se determinó la  $DL_{50}$  de  $H_2O_2$  por medio del uso del gráfico de Kaplan-Meier el cual necesita datos de supervivencia como entrada y también puede manejar eventos de censura utilizando la supervivencia media para cada grupo de muestra y el valor Log-Rank en el caso de dos grupos de muestra, que puede mostrar un valor  $p$ .

## **6.6 Análisis microbiológico**

### **6.6.1 Preparación del inóculo**

Se seleccionaron 4 ó 5 colonias del microorganismo en estudio, preferencialmente de un cultivo puro o de un cultivo en que se haya obtenido el aislamiento primario del microorganismo cuidando no utilizar cultivos de más de 24 horas, se transfirieron estas colonias, simplemente tocando la parte superior de cada una con asa bacteriológica a un tubo que contenga 100 mL de caldo nutritivo BD BIOXON estéril para la reactivación de las cepas, se incubará este cultivo a 35°C en movimiento horizontal por un tiempo de 8-12 horas hasta que se produzca un crecimiento moderado.

### **6.6.2 Siembra de la muestra**

Se tomaron 20 µL de caldo nutritivo con una micropipeta y se impregnó el centro del agar nutritivo BD BIOXON y con un asa microbiológica diseño L se sembró el inóculo uniformemente sobre la superficie del medio, se hizo esta siembra evitando inóculos muy concentrados o muy diluidos, se permitió que la superficie del medio sembrado se seque durante 5-20 minutos, manteniendo la caja con la tapa cerrada, se colocaron los discos sobre la superficie del agar nutritivo con pinzas estériles; con éstas, se presionarán los discos ligeramente sobre el agar nutritivo para asegurar un contacto uniforme, se colocaron 6 discos en la periferia dejando entre disco y disco un espacio uniforme (aproximadamente de 2 cm.); para evitar que las zonas de inhibición queden imbricadas, posteriormente se colocarán los extractos, solventes, antibióticos y antifúngicos, se incubaron las cajas inmediatamente o en los próximos 30 minutos a 35°C se leyeron las cajas después de 12-24 horas de incubación para bacterias.

### **6.6.3 Prueba de sensibilidad por medio de la técnica de sensidisco**

La prueba de sensibilidad utilizando el procedimiento del disco es una modificación de la técnica descrita por Bauer, Kirby, Sherris y Turk para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antimicrobianos preparados a partir de extractos de *E. polystachya*, *P. pseudostrobilus*, *P. leiophylla* y *P. montezumae*, en diluciones de 200, 300, 350 y 400 µg/0.25 mL de los extractos de acetona, tetrahidrofurano, metanol y agua, posteriormente se impregnaron discos de papel filtro con 0.25 µL de extracto, por otro lado se aplicó amikacina como control (+) y el DMSO 1% como control (-). Se colocaron 6 discos por caja Petri en agar nutritivo para bacterias en 3 repeticiones por cada extracto. Se utilizaron las cepas microbianas *Ralstonia picketti*, *Campylobacter jejuni*, *Raoultella terrigena*, *Micrococcus luteus* y *Kocuria palustris*. Se determinó el halo de inhibición en mm (Bernal, 1984).

#### 6.6.4 Medición de los halos de inhibición

Se midió la zona de inhibición de cada disco contra una superficie oscura bajo luz reflejada. Se midió el diámetro de la zona incluyendo el disco, con una regla vernier sobre el respaldo de la caja de Petri sin remover la tapa. Una lectura de 6 mm indica que no hay zona de inhibición.

#### 6.6.5 Técnica de inhibición de crecimiento en placa

Para la prueba de inhibición de crecimiento en placa, primero se inoculó el medio Agar Sabouraud BD BIOXON con cortes de aproximadamente  $0.5 \text{ mm}^3$  de agar Sabouraud que contenía la cepa aislada del hongo, por medio de la técnica de cubo de micelio. Se utilizaron discos de papel filtro y probetas de aproximadamente 4 cm de largo x 0.5 cm de ancho, se impregnaron con los extractos de *E. polystachya*, *P. pseudostrobilus*, *P. leiophylla* y *P. montezumae*, en diluciones de 200, 300, 350 y 400  $\mu\text{g}/0.25 \text{ mL}$  de los extractos acetona, tetrahidrofurano, metanol y agua, por otro lado se aplicó un fungicida comercial Captan como control (+) y solvente DMSO 1% como control (-), con un total de 6 discos por caja Petri y en el caso de las probetas se colocaron 2 por caja en 3 repeticiones por cada extracto para ambos ensayos. Se utilizaron las cepas de los hongos *T. versicolor* y *G. traveum* en un periodo de 7 a 14 días.

#### 6.7 Análisis estadístico

- Los ensayos *in vitro* se determinaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía y una prueba de medias Tukey y *t* de Student usando el programa GraphPad Prism 5 considerando  $p < 0.05$  como probabilidad mínima aceptable para las diferencias entre medias.
- Para medir el efecto insecticida se obtuvo a partir del cálculo del coeficiente de correlación de Pearson:
- Para medir la toxicidad en *A. salina* se obtuvo por medio de regresión lineal graficando la ecuación de la recta  $R^2$ , se realizó una curva de concentración-respuesta.
- En la evaluación antioxidante en el modelo de *C. elegans* se realizó la estimación de la función de supervivencia por el método de Kaplan Meier usando el programa GraphPad Prism 5.
- El análisis microbiológico se calculó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una prueba de medias Tukey.

## 7. Resultados

### 7.1 Evaluación del rendimiento de las extracciones con solventes en el proceso de soxhlet en las 3 diferentes especies de *Pinus* y la especie tropical *E. polystachya*

El porcentaje de extraíbles presentes en cada una de las maderas fue cuantificado por triplicado para cada extracto, y examinado por medio de la ecuación de rendimiento de Happel y Jordan. En donde presentó una concentración promedio mayor de un 80.85 % en el extracto metanólico de *P pseudostrobus*, seguido de *P. montezumae*, en donde se obtuvo un 80.66 %, en donde la especie de *P. leiophyla* que presentó un 80%, cabe mencionar que la especie de *E. polystachya* obtuvo un rendimiento de 78% en el mismo extracto. En los extractos acuosos se observaron rendimientos de entre un 20 y un 18%, seguido de los extractos de tetrahidrofurano y finalmente los acetónicos (ver Tabla iii). El mayor rendimiento se obtuvo en los extractos metanólicos de corteza de las coníferas lo que coincide con lo analizado por Gao, *et al.* 2007, en donde por medio de una extracción metanólica en soxhlet obtiene rendimientos en % (p/p) mayores en corteza interna y externa en *Chamaecyparis lawsoniana* que de albura y duramen.

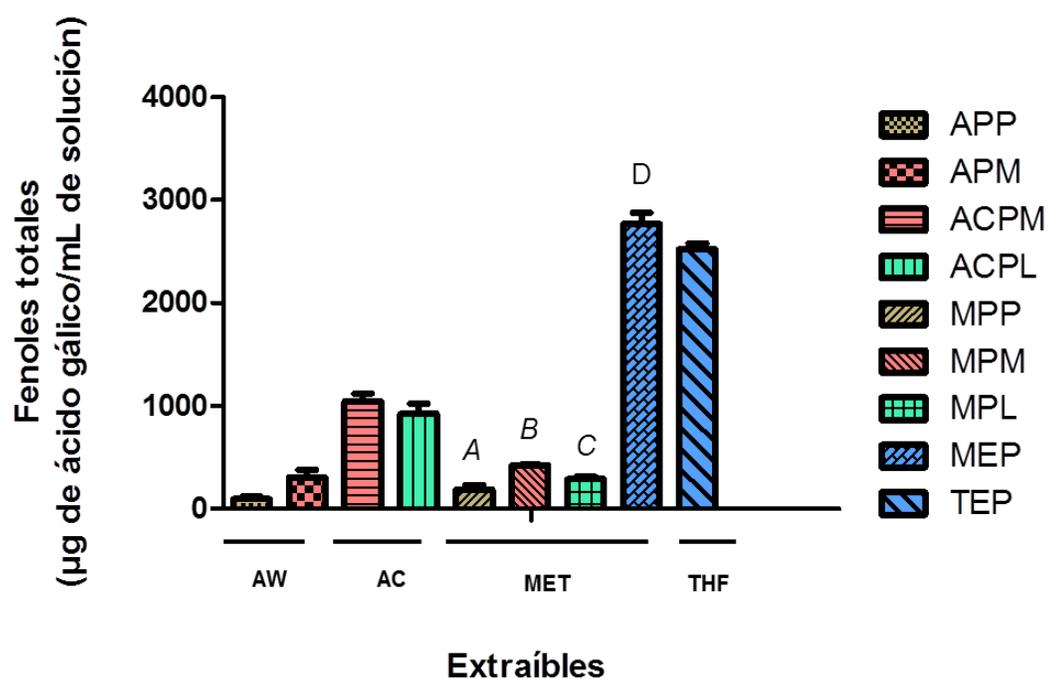
**Tabla iii** Porcentaje de rendimiento obtenido de los extractos de cuatro especies de árboles utilizando la ecuación modificada de Happel y Jordan (Pág. 25).

Especies	Solventes			
	Acetona (AC)	Metanol (MET)	Tetrahidrofurano (THF)	Agua (WA)
<i>P. leiophyla</i> (%)	0.88	80.03	2.15	24.25
<i>P. pseudostrobus</i> (%)	1.34	80.85	2.78	24.7
<i>E. polystachya</i> (%)	0.33	78.36	7.57	18.46
<i>P. montezumae</i> (%)	2.3	80.66	2.76	23.87

## 7.2 Experimentos *in vitro*

### 7.2.1 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (FOLIN)

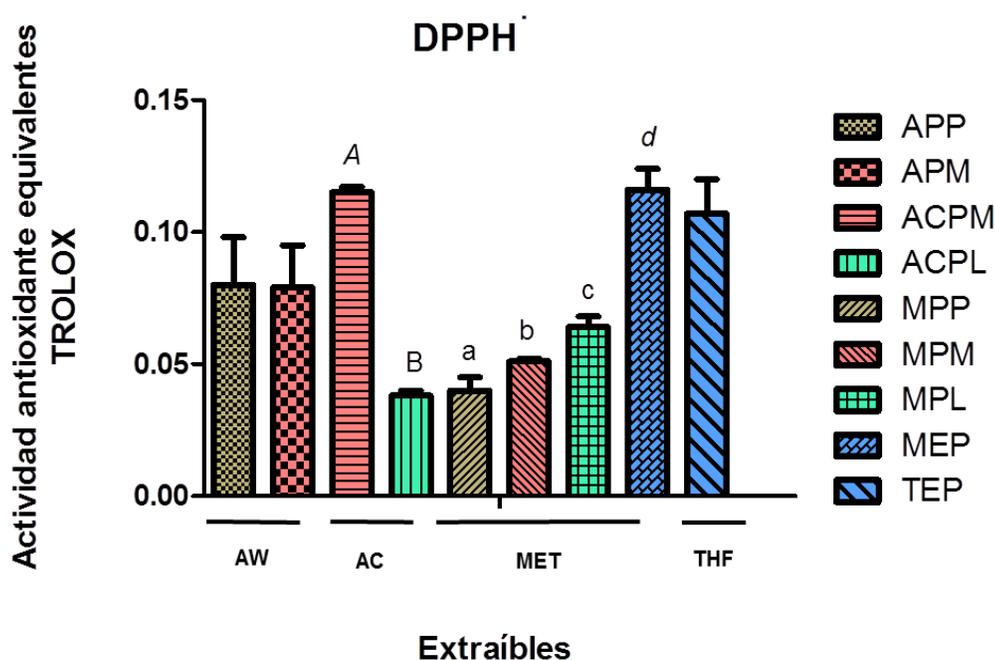
El contenido total de fenoles se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu y se expresó como equivalentes de ácido gálico en donde, los siguientes extractos de madera obtuvieron una diferencia significativa en su contenido fenólico (Fig. 12). El extracto metanólico de *P. leiophylla* mostró mayor contenido fenólico, el cual arrojó una concentración total de fenoles de 27.7 mg de ácido gálico (EAG g<sup>-1</sup>) y 2.5 EAG g<sup>-1</sup> en el extracto de THF, el extracto acetónico de *P. montezumae* obtuvo una concentración total de fenoles de 1.04 EAG g<sup>-1</sup> y el extracto acetónico de *P. leiophylla* de 0.92 EAG g<sup>-1</sup>.



**Figura 12** Contenido total de fenoles de los extractos de corteza de las tres especies de *Pinus sp.* y madera de la especie de *E. polystachya*. El ácido gálico fue usado como estándar para medir el contenido fenólico total. Cada valor es expresado con la media  $\pm$  EE (n=3). Extracto acuoso de *P. pseudostrobus* (APP), extracto metanólico de *P. montezumae* (APM), extracto acetónico de *P. montezumae* (ACPM), extracto acetónico de *P. leiophylla* (ACPL), extracto metanólico de *P. pseudostrobus* (MPP), extracto metanólico de *P. montezumae* (MPM), extracto metanólico de *P. leiophylla* (MPL), extracto metanólico de *E. polystachya* (MEP) y extracto tetrahidrofuranico de *E. polystachya* (TEP). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey. <sup>DABC</sup>p<0.05 (MEP vs MPP; MEP vs MPM; MEP vs MPL).

### 7.2.2 Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH<sup>·</sup>

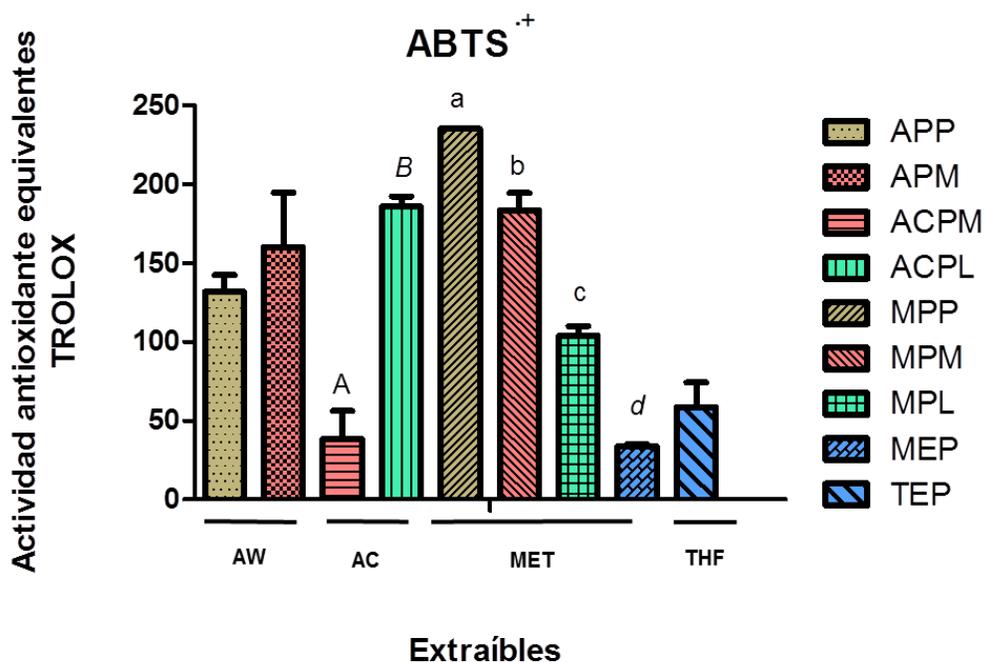
En la prueba por el método DPPH<sup>·</sup> este ensayo evalúa la actividad antioxidante de los extractos para neutralizar radicales libres de DPPH<sup>·</sup> en base al método descrito por (Brand-Williams *et al.* 1995), en donde; se observó una mayor actividad para reducir el radical DPPH<sup>·</sup>, en el extracto metanólico de *E. polystachya* y en el extracto acetónico de *P. montezumae* con valores de 0.116 y 0.115  $\mu\text{M}$  TROLOX  $\text{mL}^{-1}$  (Fig. 13).



**Figura 13** Capacidad antioxidante para la eliminación del radical DPPH<sup>·</sup> de los extractos de corteza de las tres especies de *Pinus sp.* y madera de la especie de *E. polystachya*. El TROLOX fue usado como estándar para medir la capacidad reductora del radical DPPH<sup>·</sup> en equivalentes  $\mu\text{M}$  TROLOX. Cada valor es expresado con la media  $\pm$  EE (n=3). Extracto acuoso de *P. pseudostrobus* (APP), extracto metanólico de *P. montezumae* (APM), extracto acetónico de *P. montezumae* (ACPM), extracto acetónico de *P. leiophylla* (ACPL), extracto metanólico de *P. pseudostrobus* (MPP), extracto metanólico de *P. montezumae* (MPM), extracto metanólico de *P. leiophylla* (MPL), extracto metanólico de *E. polystachya* (MEP) y extracto tetrahidrofuránico de *E. polystachya* (TEP). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey. <sup>AB</sup><0.05 (ACPM vs ACPL). <sup>dabcp</sup><0.05 (MEP vs MPP; MEP vs MPM; MEP vs MPL).

### 7.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS<sup>·+</sup>

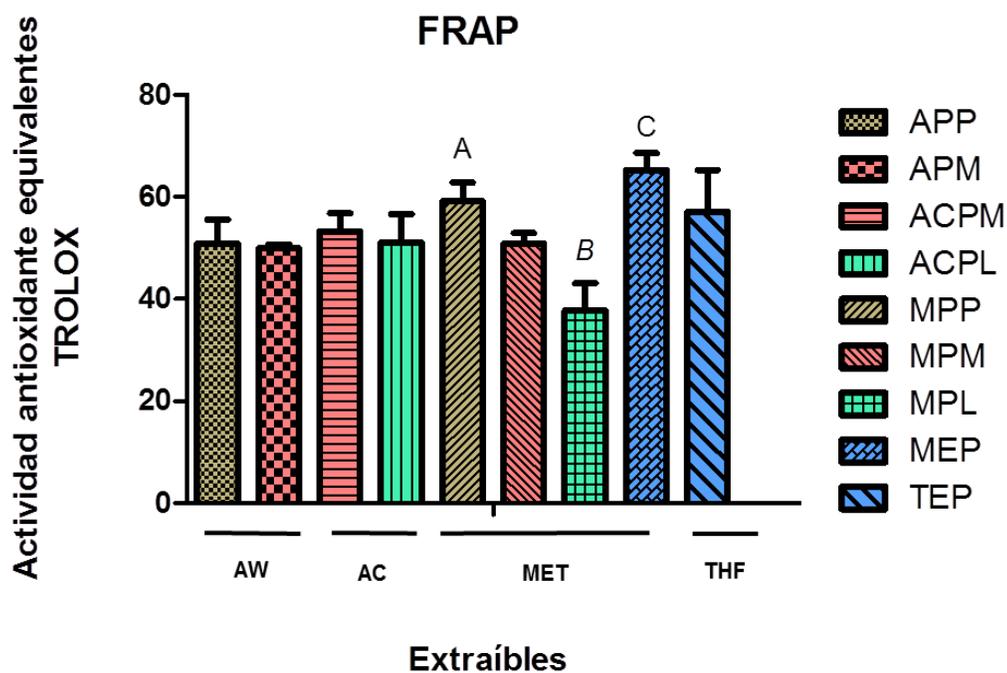
Para la prueba de captación del radical ABTS<sup>·+</sup> desarrollado por (Pellegrini, *et al.* 1999) los resultados determinaron que el extracto metanólico de *P. pseudostrobus*, *P. montezumae* y acetónico de *P. leiophylla* presentaron una mayor actividad para reducir éste radical con valores de 235.32, 185.89 y 183.69  $\mu\text{M}$  TROLOX  $\text{mL}^{-1}$ . (Fig. 14).



**Figura 14** Capacidad antioxidante para la eliminación del carbocación  $ABTS^{\cdot+}$  de los extractos de corteza de las tres especies de *Pinus sp.* y madera de la especie de *E. polystachya*. El TROLOX fue usado como estándar para medir la capacidad reductora del carbocación  $ABTS^{\cdot+}$  en equivalentes  $\mu M$  TROLOX. Cada valor es expresado con la media  $\pm$  EE (n=3). Extracto acuoso de *P. pseudostrobus* (APP), extracto metanólico de *P. montezumae* (APM), extracto acetónico de *P. montezumae* (ACPM), extracto acetónico de *P. leiophylla* (ACPL), extracto metanólico de *P. pseudostrobus* (MPP), extracto metanólico de *P. montezumae* (MPM), extracto metanólico de *P. leiophylla* (MPL), extracto metanólico de *E. polystachya* (MEP) y extracto tetrahidrofuránico de *E. polystachya* (TEP). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey. <sup>AB</sup> $p < 0.05$  (ACPM vs ACPL). <sup>dabc</sup> $p < 0.05$  (MEP vs MPP; MEP vs MPM; MEP vs MPL).

#### 7.2.4 Determinación de la capacidad antioxidante por el método FRAP

Para la determinación de la capacidad antioxidante por el método poder antioxidante de la reducción férrica que ha sido descrito previamente por (Benzie y Strain, 1996). Los valores más elevados correspondieron a las especies de *E. polystachya* y *P. pseudostrobus* de 65.33 y 59.14  $\mu M$  TROLOX  $mL^{-1}$  de los extractos metanólicos, en a pesar de la diferencia significativa entre éstos se puede observar que la capacidad antioxidante se encuentra entre los rangos de 49 a 65 a excepción del extracto acetónico de *P. leiophylla* con un rango de 38  $\mu M$  TROLOX  $mL^{-1}$  (Fig. 15).



**Figura 15** Capacidad antioxidante para la capacidad reductora del  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$  de los extractos de corteza de tres especies de *Pinus sp.* y la madera de la especie de *E. polystachya*. El TROLOX fue usado como estándar para medir la capacidad reductora del  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$  en equivalentes  $\mu M$  TROLOX. Cada valor es expresado con la media  $\pm$  EE (n=3). Extracto acuoso de *P. pseudostrobus* (APP), extracto metanólico de *P. montezumae* (APM), extracto acetónico de *P. montezumae* (ACPM), extracto acetónico de *P. leiophyla* (ACPL), extracto metanólico de *P. pseudostrobus* (MPP), extracto metanólico de *P. montezumae* (MPM), extracto metanólico de *P. leiophyla* (MPL), extracto metanólico de *E. polystachya* (MEP) y extracto tetrahydrofuránico de *E. polystachya* (TEP). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey. <sup>AB</sup>p<0.05 (ACPM vs ACPL). <sup>abcd</sup>p<0.05 (MEP vs MPP; MEP vs MPM; MEP vs MPL).

## 7.3 Experimentos *in vivo*

### 7.3.1 Actividad insecticida de extractos acuosos de corteza de especies de *P. pseudostrobis* y *P. montezume* en el modelo biológico *Anopheles aegypti*

En el ensayo de mortalidad contra *A. aegypti* en extractos acuosos no fue afectada significativamente sosteniendo una supervivencia del 100% en 12 y 24 horas del bioensayo (ver Tabla iv).

**Tabla iv** Análisis de supervivencia en *Anopheles aegypti* frente a extractos acuosos de *P. pseudostrobis* y *P. montezumae*.

Concentración	APP			APM			Porcentaje
	Tiempo (h)			Tiempo (h)			
[ ]µg/mL	0	12	24	0	12	24	
0	100	100	100	100	100	100	
10	100	100	100	100	100	100	
50	100	100	100	100	100	100	
100	100	100	83.3	100	83.3	83.3	
DMSO 1%	100	100	100	100	100	100	
R <sup>2</sup> =	-	-	0.775	-	0.775	0.775	

Proporción promedio de supervivencia en *A. aegypti* a 0, 12, y 24 horas frente a las concentraciones de 0, 10, 50, y 100 µg/mL, usando como control negativo el solvente DMSO 1%. n=3.

### 7.3.2 Actividad insecticida de extractos acetónicos de corteza de especies de *P. montezume* y *P. leiophylla* en el modelo biológico *Anopheles aegypti*

En el ensayo de mortalidad contra *A. aegypti* en extractos acetónicos no fue afectada significativamente sosteniendo una supervivencia del 100% en 12 horas y del 83.3% en 24 horas del bioensayo (ver Tabla v).

**Tabla v** Análisis de supervivencia en *Anopheles aegypti* frente a extractos acetónicos de *P. montezumae* y *P. leiophyla*.

Concentración	ACPM			ACPL			Porcentaje
	Tiempo (h)			Tiempo (h)			
[ ]µg/mL	0	12	24	0	12	24	
0	100	100	100	100	100	100	
10	100	100	100	100	100	100	
50	100	100	100	100	100	100	
100	100	100	83.3	100	83.3	83.3	
DMSO 1%	100	100	100	100	100	100	
R <sup>2</sup> =	-	-	0.775	-	0.775	0.775	

Proporción promedio de supervivencia en *A. aegypti* a 0, 12, y 24 horas frente a las concentraciones de 0, 10, 50, y 100 µg/mL, usando como control negativo el solvente DMSO 1%. n=3.

### 7.3.3 Actividad insecticida de extractos metanólicos de madera de *E. polystachya* en el modelo biológico *Anopheles*

En el ensayo de mortalidad contra *A. aegypti* en extractos metanólicos no fue afectada significativamente sosteniendo una supervivencia del 83.3 % en 12 horas mismo que se mantuvo hasta las 24 horas del bioensayo (ver Tabla vi y vii)

**Tabla vi** Análisis de supervivencia en *Anopheles aegypti* frente a extractos metanólicos de *P. pseudostrobis* y *P. montezumae*.

Concentración	MPP			MPM			Porcentaje
	Tiempo (h)			Tiempo (h)			
[ ]µg/mL	0	12	24	0	12	24	
0	100	100	100	100	100	100	
10	100	100	100	100	100	100	
50	100	100	100	100	100	100	
100	100	83.3	83.3	100	83.3	83.3	
DMSO 1%	100	100	100	100	100	100	
R <sup>2</sup> =	-	0.775	0.775	-	0.775	0.775	

Proporción promedio de supervivencia en *A. aegypti* a 0, 12, y 24 horas frente a las concentraciones de 0, 10, 50, y 100 µg/mL, usando como control negativo el solvente DMSO 1%. n=3.

**Tabla vii** Análisis de supervivencia en *Anopheles aegypti* frente a extractos metanólicos de *P. leiophylla* y *E. polystachya*.

Concentración [ $\mu\text{g/mL}$ ]	MPL			MEP			Porcentaje
	Tiempo (h)			Tiempo (h)			
	0	12	24	0	12	24	
0	100	100	100	100	100	100	
10	100	100	100	100	100	100	
50	100	100	100	100	100	100	
100	100	83.3	83.3	100	83.3	83.3	
DMSO 1%	100	100	100	100	100	100	
R <sup>2</sup> =	-	0.775	0.775	-	0.775	0.775	

Proporción promedio de supervivencia en *A. aegypti* en 0, 12, y 24 horas frente a las concentraciones de 0, 10, 50, y 100  $\mu\text{g/mL}$ , usando como control negativo el solvente DMSO 1%. n=3.

### 7.3.4 Actividad insecticida del extracto tetrahidrofuranólico de madera de *E. polystachya* en el modelo biológico *Anopheles*

En el ensayo de mortalidad contra *A. aegypti* en el extracto tetrahidrofuranólico no fue afectada significativamente sosteniendo una supervivencia del 83.3 % a las 24 horas del bioensayo (ver Tabla viii).

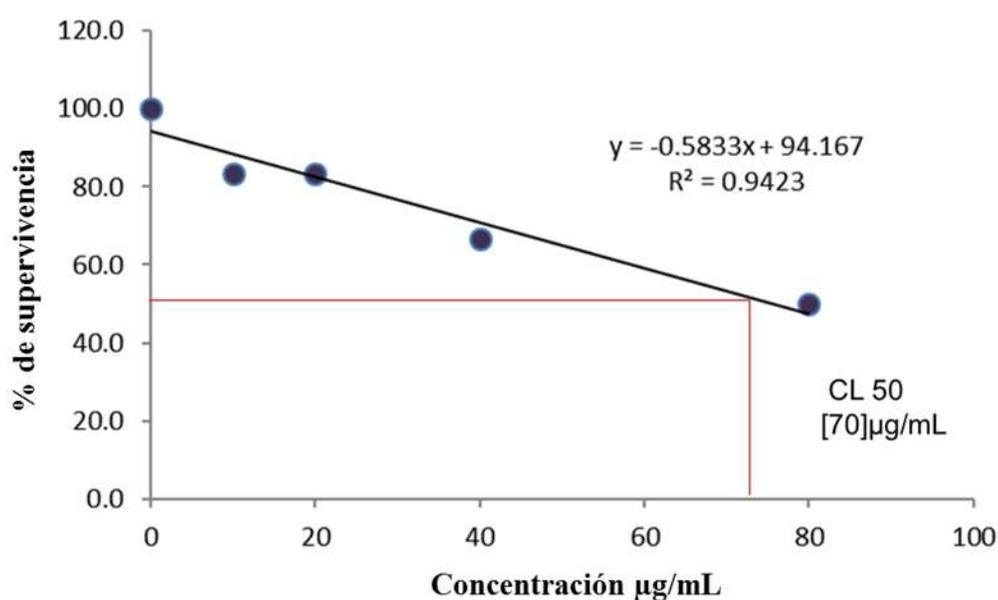
**Tabla viii** Análisis de supervivencia en *Anopheles aegypti* frente al extracto tetrahidrofuranólico de *E. polystachya*.

Concentración [ $\mu\text{g/mL}$ ]	TEP			Porcentaje
	Tiempo (h)			
	0	12	24	
0	100	100	100	
10	100	100	100	
50	100	100	100	
100	100	100	83.3	
DMSO 1%	100	100	100	
R <sup>2</sup> =	-	-	0.775	

Proporción promedio de supervivencia en *A. aegypti* a 0, 12, y 24 horas frente a las concentraciones de 0, 10, 50, y 100  $\mu\text{g/mL}$ , usando como control negativo el solvente DMSO 1%. n=3.

### 7.3.5 Efecto tóxico del extracto metanólico de *P. montezumae* por medio del cálculo de la concentración letal 50 en el modelo *A. salina*

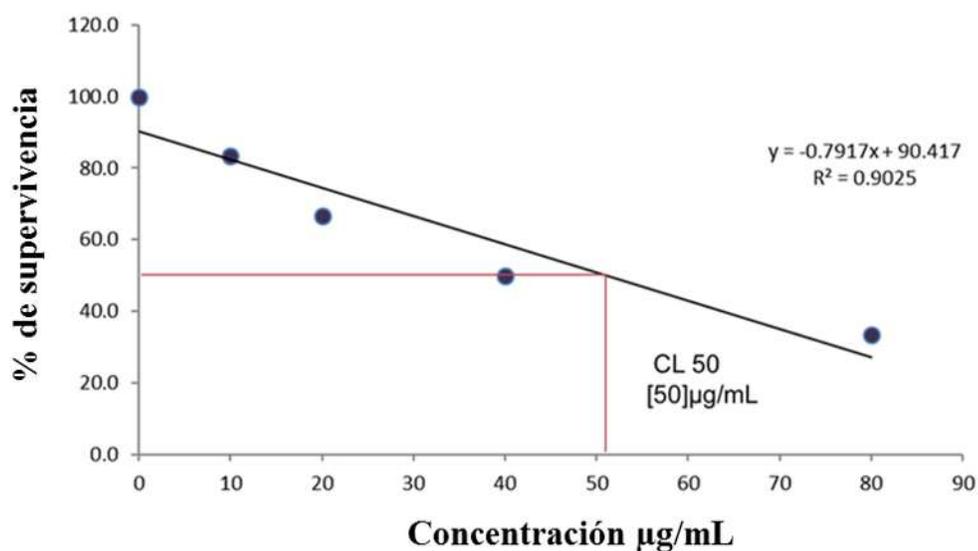
En el ensayo de supervivencia para el modelo de *A. salina* se determinó la DL<sub>50</sub> por el método de regresión lineal seleccionando aquella R<sup>2</sup> con valores mayores o iguales a 0.9 y que presentará el 100% de supervivencia para las concentraciones más bajas y el 0% de supervivencia para aquellas concentraciones más altas, en donde el extracto metanólico de *P. montezumae* obtuvo una supervivencia del 50% a 70 µg/mL (Fig. 16).



**Figura 16** Proporción promedio de supervivencia en *A. salina* a 0, 12, y 24 horas frente a las concentraciones de 0, 20, 40, 60 y 80 µg/mL. n=3.

### 7.3.6 Efecto tóxico del extracto metanólico de *P. leiophylla* por medio del cálculo de la concentración letal 50 en el modelo *A. salina*

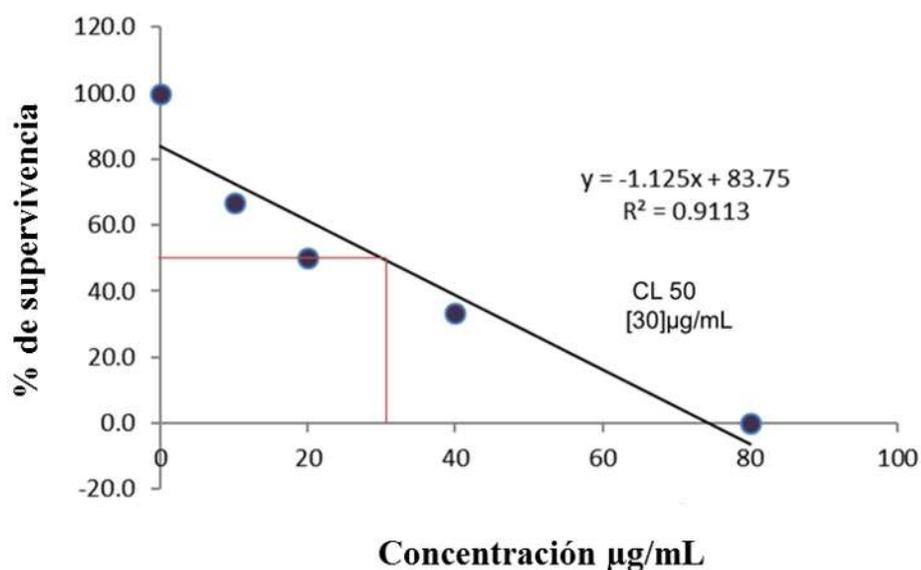
En el bioensayo para el extracto metanólico de *P. leiophylla* en el modelo de *A. salina* se obtuvo una supervivencia del 50% a 50 µg/mL (Fig. 17).



**Figura 17** Proporción promedio de supervivencia en *A. salina* a 0, 12, y 24 horas frente a las concentraciones de 0, 20, 40, 60 y 80 µg/mL. n=3.

### 7.3.7 Efecto tóxico del extracto metanólico de *E. polystachya* por medio del cálculo de la concentración letal 50 en el modelo *A. salina*

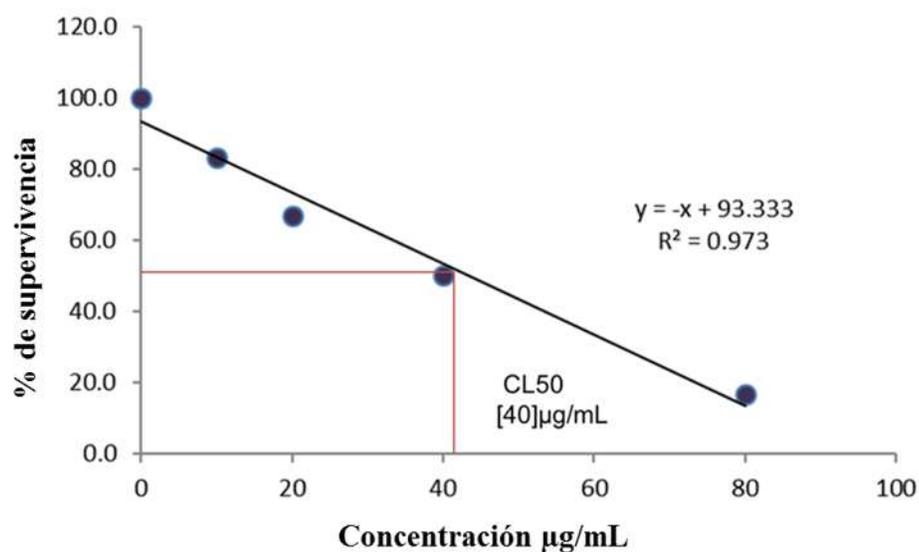
En el bioensayo para el extracto metanólico de *E. polystachya* en el modelo de *A. salina* se obtuvo una supervivencia del 50% a 30  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. 18).



**Figura 18** Proporción promedio de supervivencia en *A. salina* a 0, 12, y 24 horas frente a las concentraciones de 0, 20, 40, 60 y 80  $\mu\text{g/mL}$ . n=3.

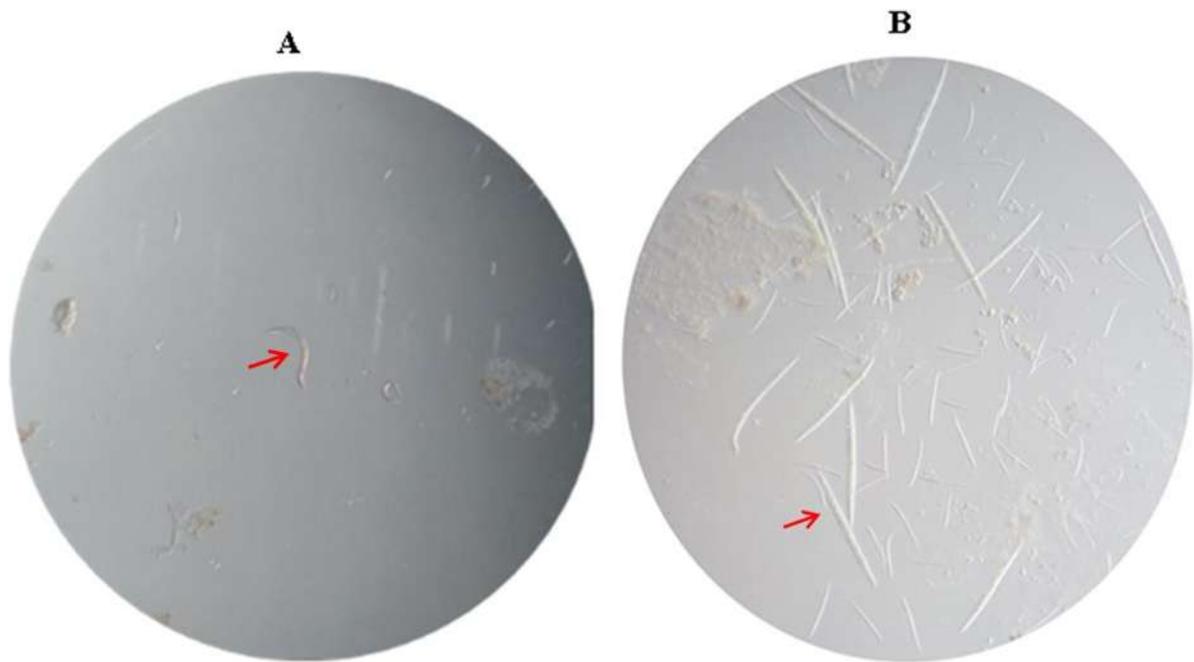
### 7.3.8 Efecto tóxico del extracto tetrahidrofuranólico de *E. polystachya* por medio del cálculo de la concentración letal 50 en el modelo *A. salina*

En el bioensayo para el extracto tetrahidrofuranólico de *E. polystachya* en el modelo de *A. salina* se obtuvo una supervivencia del 50% a 30  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. 19).



**Figura 19** Proporción promedio de supervivencia en *A. salina* a 0, 12, y 24 horas frente a las concentraciones de 0, 20, 40, 60 y 80  $\mu\text{g/mL}$ . n=3.

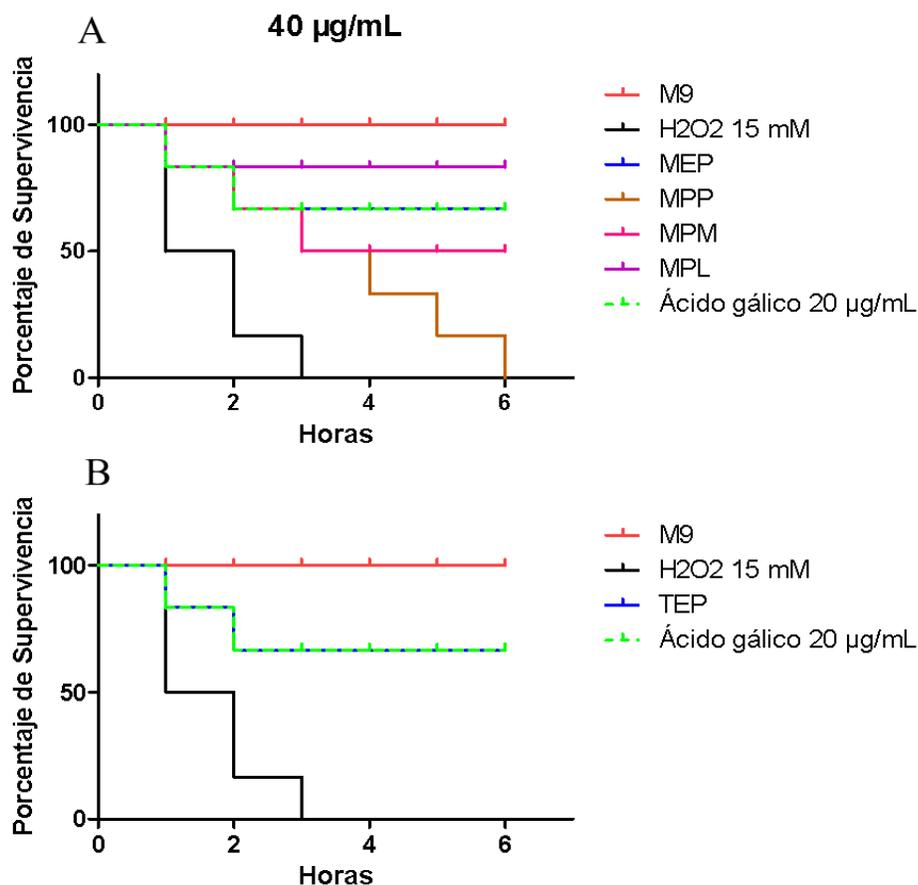
### 7.3.9 Experimentos *in vivo* para evaluar el efecto protector de los extractos en la tolerancia al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en el modelo biológico *C. Elegans* N2



**Figura 20** A. Nematodos vivos se observan curvos. B. Nematodos muertos se observan rectos. La flecha roja indica la presencia del nematodo. 60x. Se muestran los nematodos vivos ante el peróxido de hidrógeno los cuales se distribuyen en toda la región a comparación de los nematodos muertos que tienden a precipitarse en el fondo.

### 7.3.9.1 Efecto protector de los extractos en la tolerancia al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en el modelo biológico *C. Elegans* N2 a dosis de 40 µg/mL

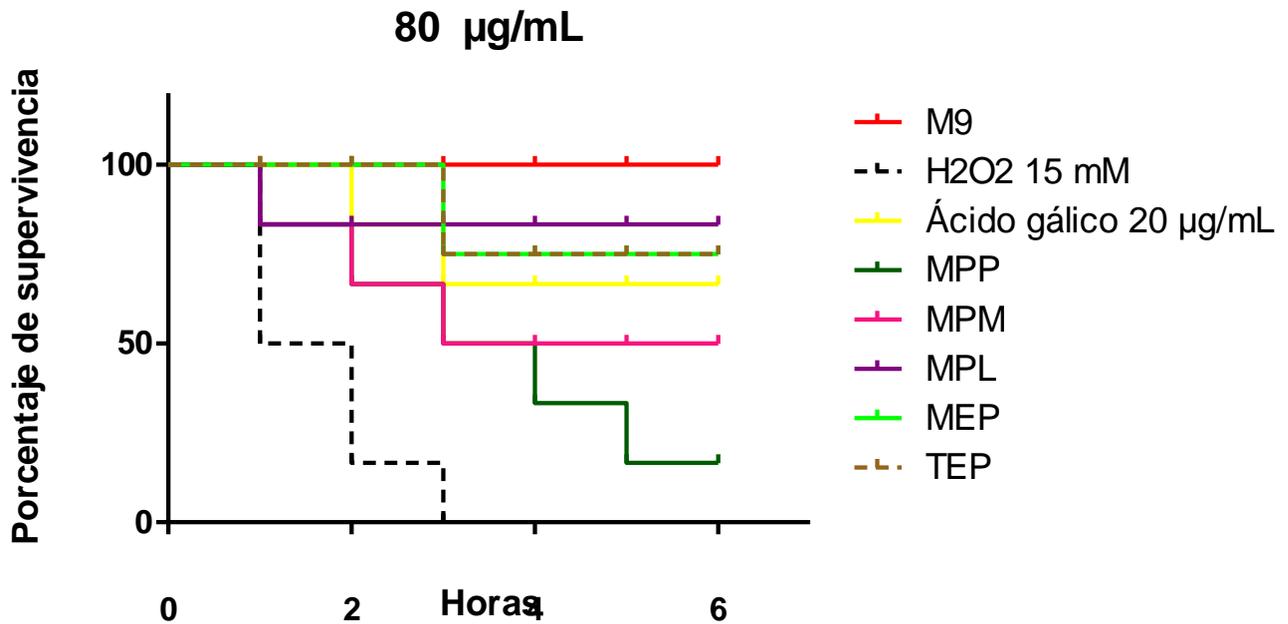
Para evaluar la actividad antioxidante *in vivo* se utilizó al nematodo *Caenorhabditis elegans* N2 el cual es muy utilizado como modelo para diversos estudios de enfermedades como diabetes, obesidad o el envejecimiento prematuro según lo descrito por (Moreno, *et al.* 2014). En el bioensayo el extracto metanólico de *P. leiophylla* obtuvo una supervivencia de un 80% seguido del extracto metanólico y tetrahidrofuranólico de *E. polystachya* con una supervivencia cercana al 70% en una dosis de 40 µg/mL (Fig. 21). Se utilizó medio M9 como control (-) y ácido gálico como control (+) en una concentración de 20 µg/mL.



**Figura 21** A) Extracto metanólico de *P. pseudostrobus* (MPP), extracto metanólico de *P. montezumae* (MPM), extracto metanólico de *P. leiophylla* (MPL), extracto metanólico de *E. polistachya* (MEP). B) Extracto tetrahidrofuranólico de *E. polistachya* (TEP). n=3.

### 7.3.9.2 Efecto protector de los extractos en la tolerancia al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en el modelo biológico *C. Elegans* N2 a dosis de 80 µg/mL

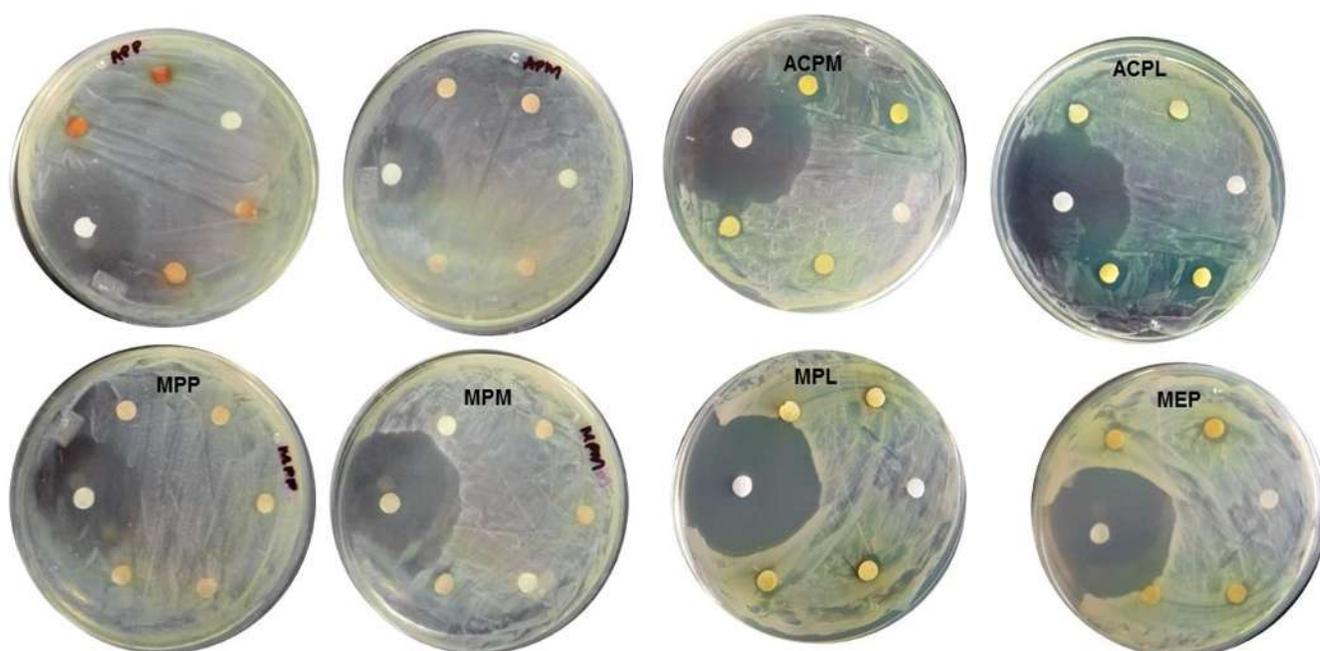
En el bioensayo el extracto metanólico de *P. leiophyla* obtuvo una supervivencia de un 80% seguido del extracto metanólico y tetrahidrofuranólico de *E. polystachya* con una supervivencia de 75% en una dosis de 80 µg/mL (Fig. 22). Se utilizó medio M9 como control (-) y ácido gálico como control (+) en una concentración de 20 µg/mL.



**Figura 22** Extracto metanólico de *P. pseudostrobilus* (MPP), extracto metanólico de *P. montezumae* (MPM), Extracto metanólico de *P. leiophyla* (MPL), extracto metanólico de *E. polistachya* (MEP) y extracto tetrahidrofuranólico de *E. polistachya* (TEP). n=3.

### 7.3.10 Medición del efecto antibacteriano en *M. luteus* por medio de la técnica sensidisco en extractos de *Pinus sp.* y *E. polystachya*

La actividad antibacteriana en extractos crudos de *Pinus sp.* y *E. polystachya*, no se muestra reflejada en la zona de inhibición, en donde el halo mayor es el control positivo Amikacina (Fig. 23).



**Figura 23** Amikacina fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. La zona de inhibición se midió en (mm). Extracto acuoso de *P. pseudostrobus* (APP), extracto metanólico de *P. montezumae* (APM), extracto acetónico de *P. pseudostrobus* (ACPP), extracto acetónico de *P. montezumae* (ACPM), extracto acetónico de *P. leiophylla* (ACPL), extracto metanólico de *P. pseudostrobus* (MPP), extracto metanólico de *P. montezumae* (MPM), extracto metanólico de *P. leiophylla* (MPL), extracto metanólico de *E. polistachya* (MEP). n=3.

### 7.3.10.1 Medición del efecto antibacteriano por medio de la técnica sensidisco en extractos acuosos de corteza en especies de *P. pseudostrobus* y *P. montezumae*

Los resultados para la actividad antibacteriana en cepas de *Micrococcus luteus*, *Campylobacter jejuni*, *Ralstonia picketti* y *Kocuria palustris* fue medida por medio de la técnica sensidisco a dosis de 200, 300, 350 y 400 µg/mL por un periodo de 24 horas, en donde la medición más alta fue a dosis de 400 µg/mL en las cepas *Micrococcus luteus* y *Campylobacter jejuni* de 3.67 mm a 3.33 mm en el extracto acuoso de *P. pseudostrobus* (ver Tabla ix). En donde por cuestiones del diseño experimental y la mezcla de extraíbles con posible efecto bactericida no fue posible observar un efecto sinérgico marcado solo una tendencia.

**Tabla ix** Actividad antibacteriana de extractos acuosos de *Pinus sp.*

Bacteria	Amikacina (µg)	APP (µg)				APM (µg)			
		200	300	350	400	200	300	350	400
<i>M. luteus</i>	17.67±0.88	-	-	1.5±0.5	3.67±0.67	-	-	0.83±0.17	1±0
<i>C. jejuni</i>	18.33±0.33	-	-	1.17±0.17	3.33±0.33	-	-	0.67±0.17	0.93±0.07
<i>R. pickettii</i>	18.67±0.3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. palustris</i>	17.83±0.93	-	-	-	-	-	-	-	-

**Inhibición en placa (mm)**

Zona no inhibida (-), Amikacina fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Los valores representan la media ± EE de la zona de inhibición en (mm). Extracto acuoso de *P. pseudostrobus* (APP), extracto acuoso de *P. montezumae* (APM). De corteza en las especies de *Pinus*. n=3. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey p<0.05.

### 7.3.10.2 Medición del efecto antibacteriano por medio de sensidisco en extractos acetónicos de corteza en especies de *P. montezumae* y *P. leiophyla*

La inhibición más alta se observó a dosis de 350 y 400 µg/mL en cepas de *Micrococcus luteus* y *Campylobacter jejuni* de 5.5 mm a 3.43 mm en el extracto acetónico de *P. leiophyla* (ver Tabla x). En donde por cuestiones del diseño experimental y la mezcla de extraíbles con posible efecto bactericida no fue posible observar un efecto sinérgico marcado solo una tendencia.

**Tabla x** Actividad antibacteriana de extractos acetónicos de *Pinus sp.*

Bacteria	Amikacina (µg)	ACPM (µg)				ACPL (µg)			
		200	300	350	400	200	300	350	400
<i>M. luteus</i>	17.67±0.88	-	-	1.03±0.03	1.07±0.07	-	1.03±0.03	3.43±0.34	5.5±0.29
<i>C. jejuni</i>	18.33±0.33	-	-	0.97±0.03	1.03±0.03	-	0.97±0.03	3.37±0.32	5.57±0.3
<i>R. pickettii</i>	18.67±0.3	-	-	-	1.07±0.07	-	-	-	1.1±0.1
<i>K. palustris</i>	17.83±0.93	-	-	-	1.03±0.03	-	-	-	1.07±0.07

**Inhibición en placa (mm)**

Zona no inhibida (-), Amikacina fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Los valores representan la media ± EE de la zona de inhibición en (mm). Extracto acetónico de *P. montezumae* (APM), extracto acetónico de *P. leiophyla* (APL). De corteza en las especies de *Pinus*. n=3. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey p<0.05.

### 7.3.10.3 Medición del efecto antibacteriano por medio de sensidisco en extractos metanólicos de corteza en especies de *Pinus*

La inhibición más alta se observó a dosis de 350 y 400  $\mu\text{g/mL}$  en cepas de *Micrococcus luteus* y *Campylobacter jejuni* de 2 mm en el extracto metanólico de *P. pseudostrobus* (ver Tabla xi). En donde por cuestiones del diseño experimental y la mezcla de extraíbles con posible efecto bactericida no fue posible observar un efecto sinérgico marcado solo una tendencia.

**Tabla xi** Actividad antibacteriana de extractos metanólicos de *Pinus sp.*

Bacteria	Amikacina ( $\mu\text{g}$ )	MPP ( $\mu\text{g}$ )				
		40	200	300	350	400
A	<i>M. luteus</i>	17.67 $\pm$ 0.88	1.03 $\pm$ 0.03	1.07 $\pm$ 0.07	3.17 $\pm$ 0.44	8.33 $\pm$ 0.67
	<i>C. jejuni</i>	18.33 $\pm$ 0.33	1.07 $\pm$ 0.07	1.17 $\pm$ 0.17	2.87 $\pm$ 0.3	6.37 $\pm$ 0.37
	<i>R. pickettii</i>	18.67 $\pm$ 0.3	-	-	-	1.03 $\pm$ 0.03
	<i>K. palustris</i>	17.83 $\pm$ 0.93	-	-	-	1.07 $\pm$ 0.07
<b>Inhibición en placa (mm)</b>						
Bacteria	Amikacina ( $\mu\text{g}$ )	MPM ( $\mu\text{g}$ )				
		40	200	300	350	400
B	<i>M. luteus</i>	17.67 $\pm$ 0.88	-	1.17 $\pm$ 0.17	1.67 $\pm$ 0.33	2.2 $\pm$ 0.15
	<i>C. jejuni</i>	18.33 $\pm$ 0.33	-	1.10 $\pm$ 0.1	1.67 $\pm$ 0.33	2.1 $\pm$ 0.06
	<i>R. pickettii</i>	18.67 $\pm$ 0.3	-	-	-	1.17 $\pm$ 0.17
	<i>K. palustris</i>	17.83 $\pm$ 0.93	-	-	-	0.83 $\pm$ 0.17
<b>Inhibición en placa (mm)</b>						

Zona no inhibida (-), Amikacina fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Los valores representan la media  $\pm$  EE de la zona de inhibición en (mm). Extracto metanólico de *P. pseudostrobus* (MPP), extracto metanólico de *P. montezumae* (MPM). n=3. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey p<0.05.

### 7.3.10.4 Medición del efecto antibacteriano por medio de sensidisco en los extractos metanólicos de madera en especie de *E. polystachya*

La inhibición más alta se observó a dosis de 300, 350 y 400 µg/mL en cepas de *Micrococcus luteus* y *Campylobacter jejuni* de +/- 2 mm en los extractos metanólicos de ambos extractos (ver Tabla xii). En donde por cuestiones del diseño experimental y la mezcla de extraíbles con posible efecto bactericida no fue posible observar un efecto sinérgico marcado solo una tendencia.

**Tabla xii** Actividad antibacteriana de extractos metanólicos de *P. leiophyla* y *E. polystachya*

	Bacteria	Amikacina (µg)	MPL (µg)			
			40	200	300	350
A	<i>M. luteus</i>	17.67±0.88	6.33±0.17	9.13±0.09	9.4±0.06	9.6±0.06
	<i>C. jejuni</i>	18.33±0.33	6.1±0.06	8.47±0.27	9.47±0.03	9.57±0.07
	<i>R. pickettii</i>	18.67±0.3	-	-	-	0.97±0.03
	<i>K. palustris</i>	17.83±0.93	-	-	-	1.03±0.09
<b>Inhibición en placa (mm)</b>						
	Bacteria	Amikacina (µg)	MEP (µg)			
			40	200	300	350
B	<i>M. luteus</i>	17.67±0.88	4.03±0.03	4.43±0.12	6.83±0.17	12.67±0.33
	<i>C. jejuni</i>	18.33±0.33	4.03±0.03	4.47±0.13	6.97±0.03	12.33±0.67
	<i>R. pickettii</i>	18.67±0.3	-	-	-	0.97±0.03
	<i>K. palustris</i>	17.83±0.93	-	-	-	1.03±0.03
<b>Inhibición en placa (mm)</b>						

Zona no inhibida (-), Amikacina fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Los valores representan la media ± EE de la zona de inhibición en (mm). Extracto metanólico de *E. polistachya* (MEP). De madera. n=3. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey p<0.05.

### 7.3.10.5 Medición del efecto antibacteriano por medio de sensidisco en los extractos metanólicos de corteza y madera de la especie *E. polystachya*

La inhibición más alta se observó a dosis de 300, 350 y 400 µg/mL en cepas de *Micrococcus luteus* y *Campylobacter jejuni* de +/- 2 mm en el extracto tetrahidrofuranólico de *E. polystachya* (ver Tabla xiii). En donde por cuestiones del diseño experimental y la mezcla de extraíbles con posible efecto bactericida no fue posible observar un efecto sinérgico marcado solo una tendencia.

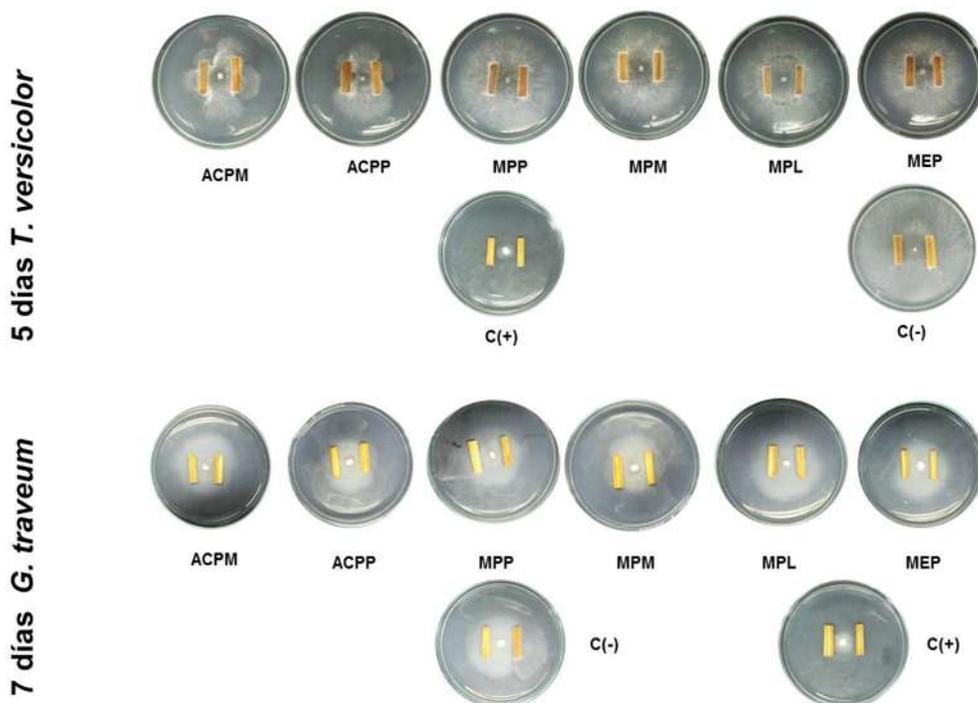
**Tabla xiii** Actividad antibacteriana del extracto tetrahidrofuranólico de *E. polystachya*

Bacteria	Amikacina (µg)	TEP (µg)			
		40	200	300	350
<i>M. luteus</i>	17.67±0.88	1.33±0.33	2.23±0.19	4.63±0.91	8.67±1.2
<i>C. jejuni</i>	18.33±0.33	1.33±0.33	2.13±0.09	4.5±1.04	8.73±1.16
<i>R. pickettii</i>	18.67±0.3	-	-	-	1±0.06
<i>K. palustris</i>	17.83±0.93	-	-	-	0.97±0.03
<b>Inhibición en placa (mm)</b>					

Zona no inhibida (-), Amikacina fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Los valores representan la media ± EE de la zona de inhibición en (mm). Extracto tetrahidrofuranólico de *E. polystachya* (TEP). De madera en *E. polystachya*. n=3. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey p<0.05.

### 7.3.11 Medición del efecto antifúngico a dosis de 350 y 400 µg de extractos de madera de *E. polystachya* y corteza de *Pinus sp.*

La actividad antifúngica de extractos crudos en *Pinus sp.* y *E. polystachya*, no se muestra reflejada en la zona de inhibición, en donde el crecimiento más limitado se ve favorecido por el uso del control positivo Captan (Fig. 24).



**Figura 24** Captan fue usado a una dosis de 400 µg como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Extracto acuoso de *P. pseudostrobus* (APP), extracto metanólico de *P. montezumae* (APM), extracto acetónico de *P. pseudostrobus* (ACPP), extracto acetónico de *P. montezumae* (ACPM), extracto acetónico de *P. leiophyla* (ACPL), extracto metanólico de *P. pseudostrobus* (MPP), extracto metanólico de *P. montezumae* (MPM), extracto metanólico de *P. leiophyla* (MPL), extracto metanólico de *E. polystachya* (MEP). n=3.

**7.3.11.1 Medición del efecto antifúngico en 350 y 400 µg en los diferentes extractos de madera en *E. polystachya* y de corteza en *Pinus* por medio de la cuantificación en (cm) de crecimiento en placa**

El crecimiento del hongo se llevó a cabo de manera normal en éstas dosis por lo tanto no fue dependiente de los extractos (ver Tabla xiv). En donde por cuestiones del diseño experimental y la mezcla de extraíbles con posible efecto antifúngico no fue posible observar un efecto sinérgico.

**Tabla xiv** Efecto antifúngico de los extractos de madera y corteza

A	Hongo	Antifúngico (µg)	APP (µg)		APM (µg)	
		400	350	400	350	400
	<i>T. versicolor</i>	4.3±0.4	9.1±0.1	9.03±0.03	9.2±0.06	9.13±0.13
	<i>G. traveum</i>	3.8±0.21	8.53±0.32	8.83±0.23	8.9±0.12	8.97±0.19
<b>Crecimiento en placa (cm)</b>						
B	Hongo	Antifúngico (µg)	ACPM (µg)		ACPL (µg)	
		400	350	400	350	400
	<i>T. versicolor</i>	4.3±0.4	8.57±0.09	7.23±0.15	8.37±0.19	7.63±0.09
	<i>G. traveum</i>	3.8±0.21	8.2±0.12	7.17±0.15	8.17±0.12	7.57±0.23
<b>Crecimiento en placa (cm)</b>						
C	Hongo	Antifúngico (µg)	MPP (µg)		MPM (µg)	
		400	350	400	350	400
	<i>T. versicolor</i>	4.3±0.4	8.47±0.15	7.4±0.21	8.37±0.12	8.27±0.12
	<i>G. traveum</i>	3.8±0.21	8.4±0.1	7.73±0.5	8.27±0.18	8.23±0.15
<b>Crecimiento en placa (cm)</b>						
D	Hongo	Antifúngico (µg)	MPL (µg)		MEP (µg)	
		400	350	400	350	400
	<i>T. versicolor</i>	4.3±0.4	8.67±0.17	8.13±0.12	8.73±0.15	7.43±0.23
	<i>G. traveum</i>	3.8±0.21	8.6±0.15	8.27±0.09	8.7±0.12	7.6±0.21
<b>Crecimiento en placa (cm)</b>						
E	Hongo	Antifúngico (µg)	TEP (µg)			
		400	350	400		
	<i>T. versicolor</i>	4.3±0.4	8.4±0.21	7.23±0.15		
	<i>G. traveum</i>	3.8±0.21	8.43±0.12	7.33±0.12		
<b>Crecimiento en placa (cm)</b>						

El compuesto captan fue usado como control positivo en una dosis de 400  $\mu\text{g}$  y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Extracto acuoso de *P. pseudoastrobus* (APP), extracto metanólico de *P. montezumae* (APM), extracto acetónico de *P. pseudoastrobus* (ACPP), extracto acetónico de *P. montezumae* (ACPM), extracto acetónico de *P. leiophylla* (ACPL), extracto metanólico de *P. pseudoastrobus* (MPP), extracto metanólico de *P. montezumae* (MPM), extracto metanólico de *P. leiophylla* (MPL), extracto metanólico de *E. polystachya* (MEP). n=3.

## 8. Discusión

En esta investigación se realizó una búsqueda de propiedades bioactivas (antioxidantes, insecticidas y tóxicas), e identificación de la presencia y contenido de compuestos fenólicos de extraíbles de corteza y madera de especies de *Pinus sp.* y *E. polystachya*.

La cuantificación de compuestos fenólicos totales de los extraíbles se puede considerar distinto entre especies arbóreas, esto se debe, a que los metabolitos secundarios (MS) son componentes clave que interactúan con el medio ambiente en la adaptación a condiciones de estrés biótico (insectos, nematodos y microorganismos patógenos) y abiótico (radiación UV, hídrico, salino, temperatura, nutricional y mecánico), obteniéndose así una gran variedad y diversidad que incluyen compuestos fenólicos, terpenoides y compuestos que contienen nitrógeno, que se encuentran de manera constitutiva en el árbol y se promueve por las situaciones de estrés, por ejemplo, la radiación UV, deficiencia de nutrientes y temperatura, aumentan la acumulación de fenilpropanoides (biosíntesis de compuestos fenólicos simples y polifenólicos) (Vardhan, *et al.* 2017).

Por otro lado, los solventes tienen afinidad química distinta para la extracción de compuestos fenólicos que va a depender de la cantidad y el tipo de moléculas químicas presentes en la corteza y madera, la capacidad de extracción de compuestos fenólicos es mayor en solventes polares (Toche, *et al.* 2017), el metanol tiene altos niveles de extracción, debido al mayor contenido de compuestos extraíbles polares que se disuelven por la amplia distribución de grupos  $-OH$  presentes, además, los solventes de polaridad intermedia (THF y AC), pueden extraer sustancias polares y apolares como ácidos grasos, terpenoides y algunos compuestos fenólicos que se encontraron en menor cantidad en madera y corteza en éstos ensayos (Ringuelet, *et al.* 2013).

Por lo tanto, la cuantificación de fenoles mostró que el extracto metanólico de madera de *E. polystachya* obtuvo mayor contenido fenólico por sobre las coníferas (Fig. 12), se puede atribuir a la pérdida de compuestos volátiles en las coníferas (fenoles y terpenos), al ser cortezas de desecho y estar expuestas al medio ambiente o al incremento de la síntesis de metabolitos secundarios en la especie tropical por condiciones áridas en tierra caliente y altos periodos de luz que van de 16 a 18 horas constantes, la síntesis de compuestos fenólicos se incrementa por la sobreexposición a la radiación UV (Taiz, *et al.* 2002), (Vardhan, *et al.* 2017).

En la prueba antioxidante para reducir el radical DPPH $\cdot$ , se observó mayor actividad en el extracto metanólico de *E. polystachya* y en el extracto acetónico de *P. montezumae* lo que indica que cuentan con

mayor cantidad de ácidos fenólicos simples con respecto de las demás coníferas (Fig. 13), que se sintetizan en el árbol para mejorar el acceso a nutrientes, por medio de la alelopatía, debido al ambiente seco y a la radiación UV, generándose menor síntesis de compuestos complejos, que favorece la presencia de compuestos precursores de la lignina para mantener las condiciones vitales del árbol, los compuestos bioactivos de *Eysenhardtia sp.* presentan propiedades de eliminación y neutralización de radicales libres (RL) moderados a fuertes contra el radical difenilpicrilhidracilo (DPPH) (Narváez, *et al.* 2018).

En los resultados de la prueba de captación del radical ABTS<sup>+</sup>, el extracto metanólico de *P. pseudostrobus*, *P. montezumae* y acetónico de *P. leiophylla* presentaron una mayor actividad para neutralizar éste radical, se puede atribuir al mayor contenido de polifenoles en las coníferas (Fig. 14), que se encuentran principalmente en la corteza de los árboles, ofrecen resistencia química, efecto disuasivo y durabilidad natural, se ha reportado que los polifenoles, flavonoides y taninos reducen a los RL, especies reactivas del oxígeno (ERO) y especies reactivas del nitrógeno (ERN), debido a su capacidad de donar un átomo de hidrógeno (Msaada, *et al.* 2017).

Se midió la capacidad antioxidante total que un compuesto tiene para reducir las moléculas prooxidantes, que pueden simular procesos de óxido- reducción en las células, de éstos fenoles por medio del método FRAP, en donde, los valores más elevados corresponden a los extractos metanólicos de *E. polystachya* y *P. pseudostrobus* (Fig. 15), la capacidad antioxidante se encuentra en rangos similares a excepción del extracto acetónico de *P. leiophylla.*, sin embargo, independientemente del tipo de estructura fenólica ya sea simple o compleja, al contener grupos reactivos –OH, son capaces de neutralizar moléculas oxidantes., en las células, los antioxidantes: 1) neutralizan los radicales libres, 2) reparan las membranas oxidadas, 3) disminuyen la producción de especies reactivas de oxígeno, 4) a través del metabolismo de los lípidos, los ácidos grasos de cadena corta y los ésteres de colesterol neutralizan las especies reactivas del oxígeno (Simioni, *et al.* 2018), la relación de las propiedades biológicas de los fenoles simples y polifenoles se centra en su actividad antioxidante, el contenido de polifenoles tiene una correlación positiva para la eliminación de radicales ABTS<sup>+</sup> y la capacidad reductora en FRAP (Rice-Evans, *et al.* 1998), (Yang, *et al.* 2018).

En el bioensayo de mortalidad contra *A. aegypti*, el diseño experimental para el control químico no permitió valorar el efecto de los extractos por la interacción dosis- tiempo sosteniendo a una supervivencia mayor al 80% (ver Tablas: iv, v, vi, vii y viii), el efecto larvicida se considera nulo al mantener ese porcentaje de susceptibilidad. Según la OMS para el control de larvas mediante el cálculo de la mortalidad

aguda se mide hasta 24 horas después de la exposición a químicos con un 100% de mortalidad en *Anopheles spp* con una residualidad de 2 a 3 meses después de la exposición y una cobertura mayor al 80% en el área sobre m<sup>3</sup>, esto se observa en la resistencia a agentes tóxicos como el hipoclorito de sodio de estas larvas, es posible, que la cantidad de compuestos fenólicos no fuera suficiente para generar un efecto tóxico, además la alta reactividad de los compuestos fenólicos es un factor que evita la perdurabilidad en el medio ambiente (Santa-María, *et al.* 2019).

*Artemia salina*, es un invertebrado que se utilizó como prueba alternativa para determinar la toxicidad de los productos químicos naturales por medio del cálculo de la DL<sub>50</sub>, que también, fue reconocido y listado como el organismo de prueba de toxicidad utilizado para el monitoreo de emisiones por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, en el bioensayo, el extracto metanólico de *E. polystachya* a una menor dosis (30 µg/mL) fue capaz de reducir la población a un 50%, a su vez, el extracto de THF de la misma especie (40 µg/mL) seguido de los extractos metanólicos de *P. montezumae* y *P. leiophylla* (Fig. 16, 17, 18 y 19), se puede atribuir, mayor toxicidad a la presencia de fenoles simples en *E. polystachya* capaces de generar toxicidad aguda en *A. salina* donde se requirió menor dosis, el aumento de la mortalidad es proporcional al aumento de la concentración, lo que proporciona una linealidad en la relación dosis-efecto de cada extracto y la determinación del valor de DL<sub>50</sub>, una sustancia orgánica ecotoxicológica en este modelo se considera bajo la concentración de 40-160 g/l después de 24 horas de exposición y 10-160 g/l después de 48 horas de exposición (Lagarto, *et al.* 2001), (Lu, 2018).

Se ha propuesto que las especies de radicales libres causan el deterioro de un organismo. Durante el metabolismo celular, los organismos aeróbicos generan ROS, radical -OH, anión superóxido y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que son eliminados o reducidos por los sistemas antioxidantes de defensa en el organismo, los polifenoles se han estudiado en varios sistemas (*in vitro* e *in vivo*) y poseen actividades biológicas, antiinflamatorias y antioxidantes, pueden regular la actividad de muchas enzimas asociadas con la promoción de la salud vascular, la función cognitiva, neuronal, el equilibrio redox y hormonal, además, actúan como antioxidantes, protegiendo contra el estrés oxidativo y la inflamación, mientras que, al mismo tiempo, reduce el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas y degenerativas (degeneración macular, cáncer, obesidad y diabetes) (Tsopmo, *et al.* 2018), el nematodo *C. elegans* es utilizado como modelo de estudio en estrés oxidativo inducido, porque se asocia a vías metabólicas de genes implicados en poblaciones humanas, que están estrechamente relacionados en el aumento o disminución de la expectativa de vida mediante la regulación de 3 vías (resistencia a insulina, estrés oxidativo y consumo metabólico) por medio de mutaciones en genes concretos de pasos metabólicos, para determinar el efecto protector de los

extractos vegetales en la tolerancia al estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se utilizó el modelo biológico *C. Elegans* N2, en dicho modelo, el extracto metanólico de *P. leiophylla* obtuvo una supervivencia de un 80% seguido del extracto metanólico y tetrahidrofuranólico de *E. polystachya* con una supervivencia +/- 70% en las dosis de 80 y 40 µg/mL (Fig. 20 y 21), con lo anterior se sugiere que, a mayor presencia de polifenoles en sinergia con los sistemas antioxidantes de defensa del mismo nematodo, los extractos de *P. leiophylla* pueden producir un efecto protector contra el estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno, el tratamiento del extracto vegetal promovió la protección de los gusanos expuestos al agente prooxidante, mostrando tasas de supervivencia mejoradas en comparación con el grupo control (Lucas, *et al.* 2018).

Las enfermedades infecciosas constituyen un problema de salud pública, debido al mal uso de antibióticos, que ha conducido, a la aparición de bacterias multiresistentes (causa principal del aumento de fracasos terapéuticos, mortalidad y altos costos de tratamiento), una nueva alternativa de tratamiento, incluye la búsqueda de sustancias antimicrobianas que sean efectivas, disponibles y de baja toxicidad, como las plantas medicinales (Ebelle, *et al.* 2018), se ha encontrado evidencia de que la resina proveniente de corteza de pino contiene flavonoides, que muestran actividad antibacteriana contra Gram-positivas y Gram-negativas, los mecanismos de acción se han atribuido a la presencia o ausencia de grupos metilo en las posiciones 6 y 8 (Nobakht, *et al.* 2017), que, en las células bacterianas producen daño parcial a la membrana, inhiben factores de virulencia (enzimas y toxinas), y suprimen la formación de biopelículas bacterianas, además, algunos polifenoles naturales, ejercen un efecto sinérgico, cuando se combinan con quimioterapéuticos comunes (Mikłasińska-Majdanik, *et al.* 2018), por lo tanto, este trabajo fue centrado en el uso de compuestos fenólicos con actividad antibacteriana contra cepas oportunistas humanas (*M. luteus*, *C. jejuni*, *R. picketti* y *K. palustris*), sin embargo, la inhibición antibacteriana de los extractos crudos utilizados bajo el método de CMI (ver Tablas ix, x, xi, xii y xiii), reveló un efecto bactericida bajo, pero, se observaron tendencias de inhibición en las dosis de 400 µg, en este caso, se puede atribuir a la tolerancia evolutiva de las cepas microbiológicas a compuestos tóxicos o al hecho de que se deben introducir algoritmos de prueba de sensibilidad *in vitro* e *in vivo* unificados para garantizar la selección de compuestos fenólicos antibacterianos efectivos con baja citotoxicidad y efectos secundarios mínimos (Mikłasińska-Majdanik, *et al.* 2018).

Teniendo en cuenta el impacto de las especies de los hongos *T. versicolor* y *G. traveum* en el deterioro de la madera, es necesario aplicar nuevas estrategias para prevenir su crecimiento, así como para eliminar o reducir su presencia en los productos maderables, debido a que, el uso de fungicidas sintéticos no es

adecuado debido a sus efectos secundarios sobre la salud humana y animal, la contaminación ambiental y el desarrollo de cepas resistentes a fungicidas (Pizzolitto, *et al.* 2015), recientemente, ha habido un gran interés en la búsqueda de fuentes naturales para controlar el crecimiento de hongos, se ha demostrado que los aceites esenciales (presentes en resina de pino) consisten en una mezcla de alcoholes terpénicos que son activos contra un gran número de microorganismos, la pared celular y la membrana fúngica se consideran sitios objetivos de los aceites y sus compuestos aislados como el ergosterol que puede interactuar con el esteroide de membrana de los hongos, debido a su carácter hidrófobo, la hipótesis principal se basa en la interacción con la bicapa lipídica de la membrana fúngica, cambiando la integridad y la permeabilidad a través de la formación de canales transmembrana que resultan en la extravasación de los constituyentes (Danielli, *et al.* 2018), por este motivo se investigó, el efecto antifúngico de extractos naturales sobre estas especies de hongos, en donde, no se observó disminución en el desarrollo de los hongos sobre la madera ni efecto protector a éstas dosis (ver Tabla xiv), se puede deber a que, éstos compuestos no son capaces de perdurar en el medio por mucho tiempo como se necesita para preservar la madera esto tiene que ver con la alta reactividad de los compuestos fenólicos debido a su fuerte capacidad antioxidante y de eliminación de radicales (Abdel, *et al.* 2016), además, se ha encontrado en extractos polares la presencia de azúcares típicos de la madera como glucosa, galactosa, arabinosa, fructosa, xilosa, manosa y ramnosa, que son principalmente responsables del crecimiento de hongos y otros agentes de biodeterioro en la madera por lo tanto tiene un efecto negativo en la durabilidad de la misma (Hosseinihashemi *et al.* 2017).

## 9. Conclusiones

Los extractos de *Pinus sp.* contienen principalmente en polifenoles y los extractos de *E. polystachya* se componen de ácidos fenólicos, además, los extractos polares de estas especies presentaron actividad tóxica en *A. salina*, también, son capaces de neutralizar las EROS en el modelo de *C. elegans*, lo que aumenta su expectativa de vida, mientras que en los ensayos antimicrobianos se observó una tendencia de inhibición del crecimiento bacteriano. Se considera que la administración de los extractos polares de las especies de *Pinus* y *E. polystachya*, reducen el daño oxidativo provocado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tienen potencial para su uso en ensayos anticancerígenos.

## **10. Perspectivas**

- Realizar un estudio comparativo entre maderas frescas, cortezas frescas, y expuestas de desecho.
- Caracterizar los compuestos químicos de los extractos y evaluar su actividad antioxidante por separado.
- Realizar bioensayo en las líneas celulares Caco-2 y HeLa-S3 para evaluar su efecto anticancerígeno.

## 11. Bibliografía

1. Abdel lateif, K. S., Maghrabi, I. A., & Eldeab, H. A. (2016). The Plant Natural Products: Their Antioxidants, Free Radical Scavengers, DNA Protection and Antimicrobial Activities. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 06(09). doi:10.4172/2155-9821.1000293
2. Ávalos, A. Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3), 119-145. [http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo\\_secundario\\_de\\_plantas.pdf](http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf)
3. Baca-Bocanegra, B., Nogales-Bueno, J., Hernández-Hierro, J. M., & Heredia, F. J. (2018). Evaluation of extractable polyphenols released to wine from cooperage byproduct by near infrared hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, 244, 206–212. doi:10.1016/j.foodchem.2017.10.027
4. Barapatre, A., Meena, A. S., Mekala, S., Das, A., & Jha, H. (2016). In vitro evaluation of antioxidant and cytotoxic activities of lignin fractions extracted from *Acacia nilotica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 443–453. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.109
5. Barrales, H. J. Soto, R.M. (2012). TAXOIDES: METABOLITOS SECUNDARIOS DEL ÁRBOL DEL TEJO (*Taxus spp.*). *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 18(2), 207-218.
6. Benzie, I. and Strain, J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power: The FRAP Assay”. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
7. Bernal, M., Guzmán, U. (1984). EL ANTIBIOGRAMA DE DISCOS. NORMALIZACIÓN DE LA TECNICA DE KIRBY-BAUER. *Biomedica*, 4(3): 1-10.
8. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity *LWT - Food Science and Technology* 28(1):25–30.
9. C. Kaur, H.C. Kapoor, Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables, *Int. J. Food Sci. Technol.* (2002) 153–161.
10. Candolle, A., (1845). *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis* 9: 474
11. Carrillo-Parra, A., Rosales, M., Wehenkel, C., Foroughbakhch, R., González, H., Garza, H. (2012). PHENOLS AND FLAVONOIDS CONCENTRATION AND FUNGISTATIC

- ACTIVITY OF WOOD AND BARK OF FIVE COMMON TROPICAL SPECIES. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 15: 621 – 628.
12. Centelles, J. J. & Imperial, S. (2010). Paclitaxel. Descubrimiento, Propiedades y Uso Clínico. *Ámbito Farmacéutico Fitoterapia*, 29(4), 69-75.
  13. Conabio. (2018). Pino chamaite (*Pinus montezumae*) Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, 1-4. <http://www.enciclovida.mx/especies/6019353.pdf?from=>
  14. Conabio. (2018). Pino chimonque (*Pinus leiophylla*). Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, 2-4. <http://www.enciclovida.mx/especies/6019408>
  15. Contreras, W., Owen, E., & Cloquell, V. (2005). Conceptualización y propuesta taxonómica de productos forestales, 52–57. [http://infomadera.net/uploads/articulos/archivo\\_4972\\_23306.pdf](http://infomadera.net/uploads/articulos/archivo_4972_23306.pdf)
  16. Coronado, M. Vega, S. Gutiérrez, L. Vázquez, M. Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr.*42 (2), 206-211. <http://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf>
  17. Danielli, L. J., Pippi, B., Duarte, J. A., Maciel, A. J., Lopes, W., Machado, M. M., Apel, M. A. (2018). Antifungal mechanism of action of *Schinus lentiscifolius* Marchand essential oil and its synergistic effect in vitro with terbinafine and ciclopirox against dermatophytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(9), 1216–1227. doi:10.1111/jph.12949
  18. Dittz, D., Figueiredo, C., Lemos, F. O., Viana, C. T. R., Andrade, S. P., Souza-Fagundes, E. M., Lopes, M. T. P. (2015). Antiangiogenesis, Loss of Cell Adhesion and Apoptosis Are Involved in the Antitumoral Activity of Proteases from *V. cundinamarcensis* (*C. candamarcensis*) in Murine Melanoma B16F1. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 7027–7044. <http://doi.org/10.3390/ijms16047027>
  19. Ebelle Etame, R., Mouokeu, R. S., Cidjeu Pouaha, C. L., Voukeng Kenfack, I., Tchientcheu, R., Assam Assam, J. P., Monthe Poundeu, F. S., Tchinda Tiabou, A., Etoa, F. X., Kuate, J. R., Ngonu Ngane, R. A. (2018). Effect of Fractioning on Antibacterial Activity of *Enantia chlorantha* Oliver (*Annonaceae*) Methanol Extract and Mode of Action. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2018, 4831593. doi:10.1155/2018/4831593
  20. Esparza-Díaz, Gabriela, López-Collado, José, Villanueva-Jiménez, Juan A., Osorio-Acosta, Francisco, Otero-Colina, Gabriel, & Camacho-Díaz, Eloy. (2010). Concentración de azadiractina, efectividad insecticida y fitotoxicidad de cuatro extractos de *Azadirachta indica* A. Juss. *Agrociencia*, 44(7), 821-833. Recuperado en 11 de diciembre de 2018, de

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952010000700008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952010000700008&lng=es&tlng=es).

21. Esquivel-Gutiérrez, E. R., Noriega-Cisneros, R., Saavedra-Molina, A. & Salgado-Garciglia R. (2013). Plants used in Mexican folk medicine with antidiabetic and antihypertensive properties. Newsletter, 2, 15-23.
22. Fekih, N., Allali, H., Merghache, S., Chaïb, F., Merghache, D., El Amine, M., Djabou, N., Muselli, A., Tabti, B., Costa, J. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 4(2), 97–103.
23. Fernández, C. (2001). La madera: Composición, alteraciones y restauración. Boletín del Museo de las Villas Pasiegas. [http://grupos.unican.es/acanto/aep/BolPas/la\\_madera\\_BMVP-2001.htm#\\_ftn2](http://grupos.unican.es/acanto/aep/BolPas/la_madera_BMVP-2001.htm#_ftn2)
24. Frédérick, M., Marcowycz, A., Cieckiewicz, E., Mégalizzi, V., Angenot, L. & Kiss, R. (2009). In Vitro Anticancer Potential of Tree Extracts from the Walloon Region Forest. Planta Med, 75, 1634-1637.
25. Gao, H., Shupe, T. F., Eberhardt, T. L., & Hse, C. Y. (2007). Antioxidant activity of extracts from the wood and bark of *Port Orford* cedar. Journal of Wood Science, 53(2), 147–152. doi:10.1007/s10086-006-0850-z
26. Gracia, C. (2010). La madera. Ecología Forestal: Estructura, Funcionamiento y Producción de las masas forestales. [http://www.ub.edu/ecologia/carlos.gracia/PublicacionesPDF/La\\_madera.pdf](http://www.ub.edu/ecologia/carlos.gracia/PublicacionesPDF/La_madera.pdf)
27. Gutierrez, R. M., & Baez, E. G. (2014). Evaluation of antidiabetic, antioxidant and antiglycating activities of the *Eysenhardtia polystachya*. Pharmacognosy magazine, 10(Suppl 2), S404-18.
28. Hepper, F., Wood, J. R. I., Fall, A. D., Ibra, S., Dieng, M., Diatta-badji, K., ... Bassene, E. (2017). Phytochemical screening, phenol content and antioxidant studies of ethanol leaf extract of *Celtis toka*, 6(1), 488–492.
29. Hernández, L. Romero, F. (2008). Bosques, árboles y arbustos. Manual de especies ibéricas. WWF España. [http://awsassets.wwf.es/downloads/especies\\_arboreas2\\_1.pdf](http://awsassets.wwf.es/downloads/especies_arboreas2_1.pdf)
30. Hosseinihashemi, S. K., Salem, M. Z. M., HosseinAshrafi, S. K., & Latibari, A. J. (2016). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Extract from the Wood of *Fagus orientalis*:

- Water Resistance and Decay Resistance against *Trametes versicolor*. *BioResources*, 11(2). doi:10.15376/biores.11.2.3890-3903
31. Isah, T. (2016). Anticancer Alkaloids from Trees: Development into Drugs. *Pharmacognosy Reviews*, 10(20), 90–99. <http://doi.org/10.4103/0973-7847.194047>
  32. ISO. 2010. Determination of the Toxic Effect of Sediment and Soil Samples on Growth, Fertility and Reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda): Water Quality
  33. Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Statistical Association*. 1958; 53:457–481.
  34. Kuklinski, C. (2003). Farmacognosia estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. <http://qfuatlantico.blogspot.mx/2015/03/farmacognosia-kuklinski-pdf.html>
  35. Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., García-Parilla, M. C. y Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Rev Bras Ciênc Tecnol Alim*. 24(4): 691-693.
  36. Lagarto, A., Silva, R., Guerra, I., Iglesias, L. (2001). Comparative study of the assay of and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), 395–400. doi:10.1078/0944-7113-00044
  37. Liu, M., Xing, Q. L., Weber, C., Yong, L. Ch., Brown, J. y Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J Agric Food Chem* 50:2926:2930.
  38. López, L. I., Leyva, E. & García de la Cruz, R. F. (2011). Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 42(1), 6-17. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57918590002>
  39. López-Carreras, N. Miguel, M. y Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutr. clín. diet. hosp*. 32(3): 81-91
  40. Lu, Y., Yu, J., *Artemia* spp. Model - A Well-Established Method for Rapidly Assessing the Toxicity on an Environmental Perspective . *Medical Research Archives*. (6)2, 2-15.
  41. Lucas dos Santos, E., Leite, N., Alves de Araújo, L. C., Giffoni de Carvalho, J. T., & Souza, K. de P. (2018). Protective effect of *Annona crassiflora* on oxidative stress and Alzheimer's models in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*, 128, S125. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.307
  42. Martínez, M. (1994). Catálogo de nombres vulgares y científicos de las plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica de México. Compañía Editorial Continental. México D.F.

43. Mikłasińska-Majdanik, M., Kępa, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., & Wąsik, T. J. (2018). Phenolic Compounds Diminish Antibiotic Resistance of *Staphylococcus Aureus* Clinical Strains. *International journal of environmental research and public health*, 15(10), 2321. doi:10.3390/ijerph15102321
44. Mirzaei A., Mirzaei N. y Ghavamizadeh M. (2013). Antioxidant Activity and Cytotoxicity of *Dorema aucheri* by *Artemia urmiana*: a Brine Shrimp Lethality Test. *Life Science Journal* 10(12). pp: 8-12.
45. Moreno E., Cárdenas N., Coballase E., Pedraza J., Carmona L. y Ortega D. (2014). *Caenorhabditis elegans*: A Useful Model for Studying Metabolic Disorders in Which Oxidative Stress Is a Contributing Factor. *Oxid. Med. Cell. Longevity*. 2014: 1-9
46. Mothana, R. A., Khaled, J. M., Noman, O. M., Kumar, A., Alajmi, M. F., Al-Rehaily, A. J., & Kurkuoglu, M. (2018). Phytochemical analysis and evaluation of the cytotoxic, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from three *Plectranthus* species grown in Saudi Arabia. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 237. doi:10.1186/s12906-018-2302-x
47. Msaada K., Jemia M. B., Salem N., Bachrouch O., Sriti J., Tammar S., Bettaieb I., Jabri I., Kefi S., Limam F. y Marzouck B. 2017. Antioxidant activity of methanolic extracts from three coriander (*Coriandrum sativum L.*) fruit varieties. *Arabian Journal of Chemistry* 10(2): 3176-3183
48. Muñoz, D. R. & Cuca, L. E. (2015). Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). *Rev Colomb Cancerol*, 20(3). 124-134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rccan.2015.10.002>
49. Narváez-Mastache, J. M., Novillo, F., & Delgado, G. (2008). Antioxidant aryl-prenylcoumarin, flavan-3-ols and flavonoids from *Eysenhardtia subcoriacea*. *Phytochemistry*, 69(2), 451–456. doi:10.1016/j.phytochem.2007.07.019
50. Nayak, M., Nagarajan, A., Majeed, M., & Mundkur, L. A. (2017). Evaluation of in vitro antioxidant potential, anti-inflammatory activity and melanogenesis inhibition of *Artocarpus hirsutus Lam.* extracts, 6(1).
51. Ninomiya, K., Chaipech, S., Kunikata, Y., Yagi, R., Pongpiriyadacha, Y., Muraoka, O., & Morikawa, T. (2017). Quantitative determination of stilbenoids and dihydroisocoumarins in *shorea roxburghii* and evaluation of their hepatoprotective activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms18020451>

52. Nobakht, M., Trueman, S. J., Wallace, H. M., Brooks, P. R., Streeter, K. J., & Katouli, M. (2017). Antibacterial Properties of Flavonoids from Kino of the Eucalypt Tree, *Corymbia torelliana*. *Plants* (Basel, Switzerland), 6(3), 39. doi:10.3390/plants6030039
53. Núñez, Carlos E. (2009). Distribución Radial de Polifenoles en Troncos de *Eucalyptus grandis*: Radial Distribution of Polyphenols in the Stems of *Eucalyptus grandis*. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (11), 20-25. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-75872009000100004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872009000100004&lng=es&tlng=es).
54. Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278.
55. Pant, D. R., Pant, N. D., Saru, D. B., Yadav, U. N., & Khanal, D. P. (2017). Phytochemical screening and study of antioxidant, antimicrobial, antidiabetic, anti-inflammatory and analgesic activities of extracts from stem wood of *Pterocarpus marsupium* Roxburgh. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 6(2), 170–176. <https://doi.org/10.5455/jice.20170403094055>
56. Pennington, T.D., y J. Sarukhán. (2005). Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies, 3a. ed. Universidad Nacional Autónoma de México-Fondo de Cultura Económica, México.
57. Perez, C. (1993). ANATOMIA DE LA MADERA DE OCHO ESPECIES CON IMPORTANCIA EN LAS ARTESANIAS DEL ESTADO DE MICHOACAN. *Acta Botánica Mexicana*, 23:103-136
58. Pizzolitto, R. P., Barberis, C. L., Dambolena, J. S., Herrera, J. M., Zunino, M. P., Magnoli, C. E., Dalcero, A. M. (2015). Inhibitory Effect of Natural Phenolic Compounds on *Aspergillus parasiticus* Growth. *Journal of Chemistry*, 2015, 1–7. doi:10.1155/2015/547925
59. Pradeepkumar, B. Bhavyamadhuri, C. Padmanabhareddy, Y. Veerabhadrapppa, KV. Gorantla, N. Haranath, C. Somasekharreddy, K. & Akkiraju, S. (2017). Evaluation of Antiulcer Activity of *Peltophorum Pterocarpum*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(6), 2015–2017. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/26171.9998>
60. Priess J. R., Hirsh D. I. (1986). *Caenorhabditis elegans* morphogenesis: the role of the cytoskeleton in elongation of the embryo. *Dev. Biol.* (1): 156-173
61. Quiñones, M., Miguel, M. & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 27(1), 76-89. ISSN 0212-1611

62. Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159. doi:10.1016/s1360-1385(97)01018-2
63. Ringuelet, J. A., Viña, Z. S, Arango, M., Henning, C., Yordaz, R. (2013) .Productos naturales vegetales. Universidad Nacional de La Plata. E-Book. ISBN 978-950-34-0971-8
64. Rosales, M. & González, R. F. (2003). Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. *Madera y Bosques*, 9(2), 41-49. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61790204>
65. Salem, M. Z. M., El-Hefny, M., Ali, H. M., Elansary, H. O., Nasser, R. A., El-Settawy, A. A. A., Salem, A. Z. M. (2018). Antibacterial activity of extracted bioactive molecules of *Schinus terebinthifolius* ripened fruits against some pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 120, 119–127. doi:10.1016/j.micpath.2018.04.040
66. Salem, M. Z. M., EL-Hefny, M., Nasser, R. A., Ali, H. M., El-Shanhorey, N. A., & Elansary, H. O. (2017). Medicinal and biological values of *Callistemon viminalis* extracts: History, current situation and prospects. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(3), 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.03.015>
67. Santa Maria, M., Londoño, B., Urquijo, L., Díaz, A., Padilla, J., (2019) Guía de Vigilancia Entomológica y Control de Malaria. Ministerio de la Protección Social.Dirección General de Salud Pública Grupo Salud Ambiental Enfermedades Transmitidas por Vectores. 1-130. [https://www.paho.org/col/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=p-ublicaciones-ops-oms-colombia&alias=1221-gestion-para-la-vigilancia-entomologica-y-control-de-la-transmision-de-malaria&Itemid=688](https://www.paho.org/col/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=p-ublicaciones-ops-oms-colombia&alias=1221-gestion-para-la-vigilancia-entomologica-y-control-de-la-transmision-de-malaria&Itemid=688)
68. Sargent, C. (1892). *The Silva of North America* 3: 29. <http://www.tropicos.org/NamePublicationDetail.aspx?nameid=13009345>
69. Schlotterer A., Kukudov G., Bozorgmehr F., Hutter H., Du X., Oikonomou D., Ibrahim Y., Pfisterer F., Rabbani N., Paul Thornalley P., Sayed A., Fleming T., Per Humpert P., Schwenger V., Zeier M., Hamann A., Stern D., Brownlee M., Bierhaus A., Peter Nawroth P., Morcos M. (2009). *C. elegans* as Model for the Study of High Glucose– Mediated Life Span Reduction. *Diabetes*. 58: 2450-2456.
70. Simioni, C., Zauli, G., Martelli, A. M., Vitale, M., Sacchetti, G., Gonelli, A., & Neri, L. M. (2018). Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget*, 9(24), 17181-17198. doi:10.18632/oncotarget.24729

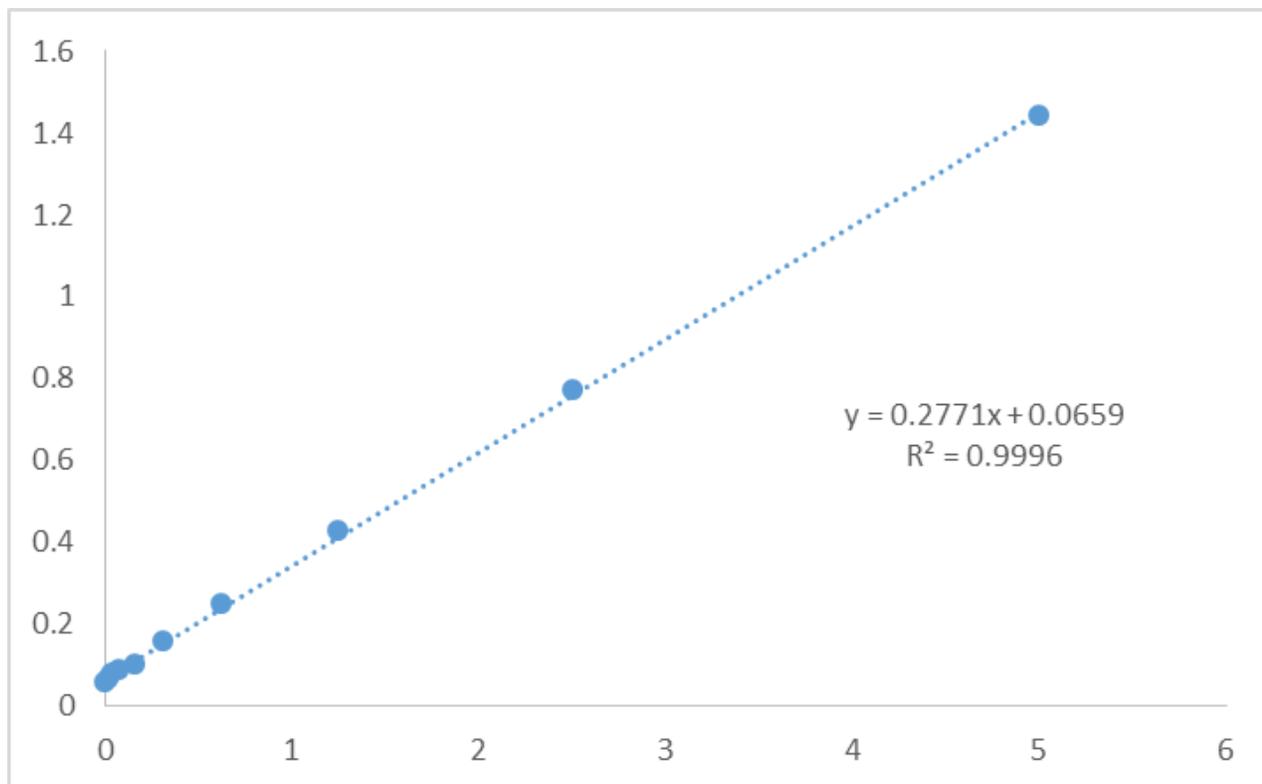
71. Singleton, V. L. y Rossi, J. A. Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents Am. J. Enol. Vitic 16:144-158.
72. Solis G.M., Petrascheck M. (2011). Measuring *Caenorhabditis elegans* Life Span in 96 Well Microtiter Plates. J Vis Exp. 49: 2496.
73. Sorgeloos P., Lavens P., Lé P., Tackaert W. y Versichele D. (1986). Manual para el Cultivo y Uso de Artemia en Acuicultura. Programa Cooperativo Gubernamental FAO-Italia
74. Taiz L. y Zeiger E. (2002). Plant Physiology. Sunderland: Sinauer 3ª edición. 690(13), (284-307). ISBN: 0878938230
75. Tavčar Benković, E., Žigon, D., Mihailović, V., Petelinc, T., Jamnik, P., & Kreft, S. (2017). Identification, in vitro and in vivo antioxidant activity, and gastrointestinal stability of lignans from silver fir (*Abies alba*) wood extract. Journal of Wood Chemistry and Technology, 3813(July), 1–11. <https://doi.org/10.1080/02773813.2017.1340958>
76. Toche Tuesta A, Curay Carhuamaca VL, Diaz Barrientos R, Fernández Rebaza GA, Bonilla Rivera PE. Es-estructura química de compuestos fenólicos del extracto etanólico de hojas de *Clinopodium pul-chellum* (Kunth) Govaerts “pa-nisara”. Rev Peru Med Integra-va.2017; 2 (3):803-9.
77. Tsopmo, A. (2018). Phytochemicals in Human Milk and Their Potential Antioxidative Protection. Antioxidants, 7(2), 32. doi:10.3390/antiox7020032
78. UPADHYAY, A., CHOMPOO, J., TAIRA, N., FUKUTA, M., & TAWATA, S. (2013). Significant Longevity-Extending Effects of *Alpinia zerumbet* Leaf Extract on the Life Span of *Caenorhabditis elegans*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 77(2), 217–223. doi:10.1271/bbb.120351
79. Vardhan, P. V., & Shukla, L. I. (2017). Gamma irradiation of medicinally important plants and the enhancement of secondary metabolite production. International Journal of Radiation Biology, 93(9), 967–979. doi:10.1080/09553002.2017.1344788
80. WormAtlas. <http://www.wormatlas.org>. Accesado 27/ago/2017.
81. Yang, X.-J., Dang, B., & Fan, M.-T. (2018). Free and Bound Phenolic Compound Content and Antioxidant Activity of Different Cultivated Blue Highland Barley Varieties from the Qinghai-Tibet Plateau. Molecules, 23(4), 879. doi:10.3390/molecules23040879
82. Zhang, H., Zhao, H., Yao, L., Yang, X., Shen, S., Wang, J., Geng, L. (2017). Isolation, physicochemical properties, and in vitro antioxidant activity of polysaccharides extracted from

different parts of *Pinus koraiensis*. Journal of Wood Chemistry and Technology, 37(3), 225–240. <https://doi.org/10.1080/02773813.2016.1272125>

## 12. Anexos

### ANEXO A

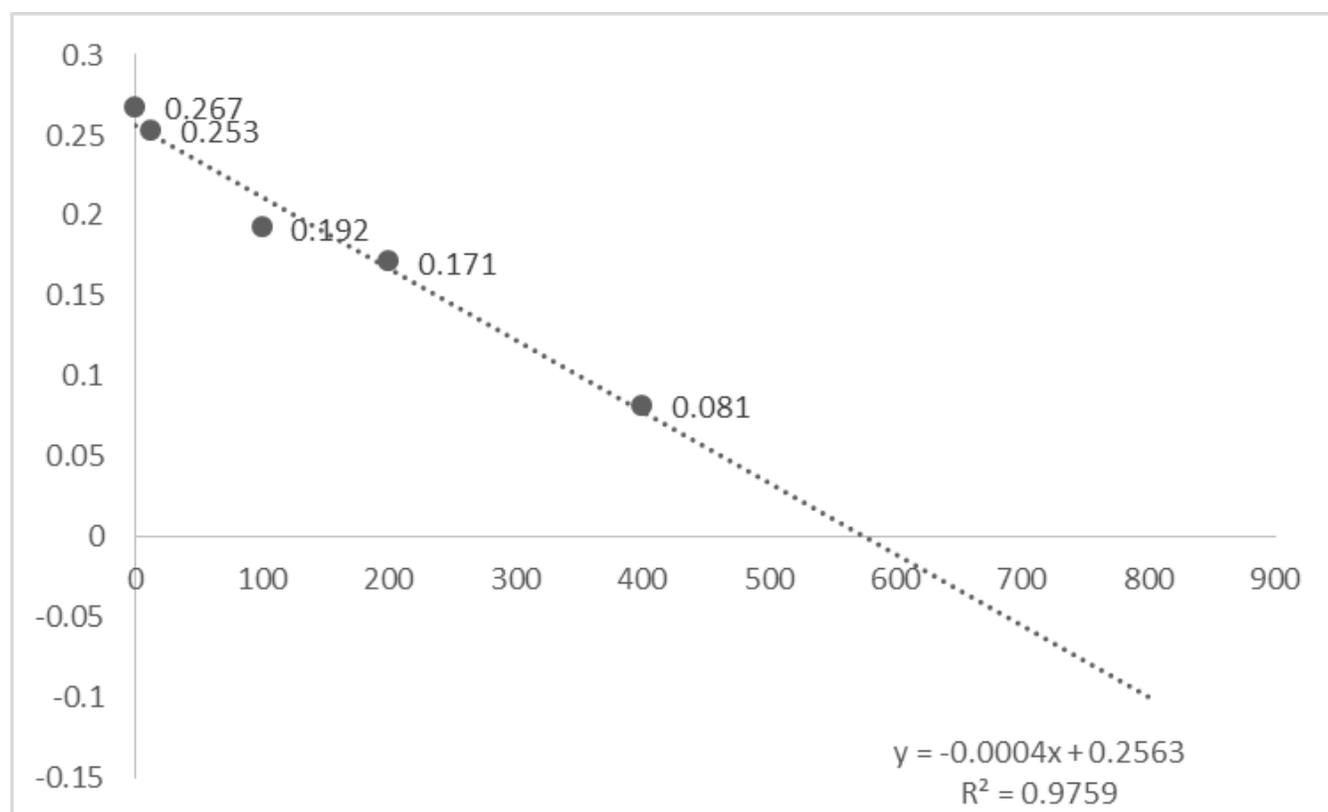
#### Contenido de compuestos fenólicos



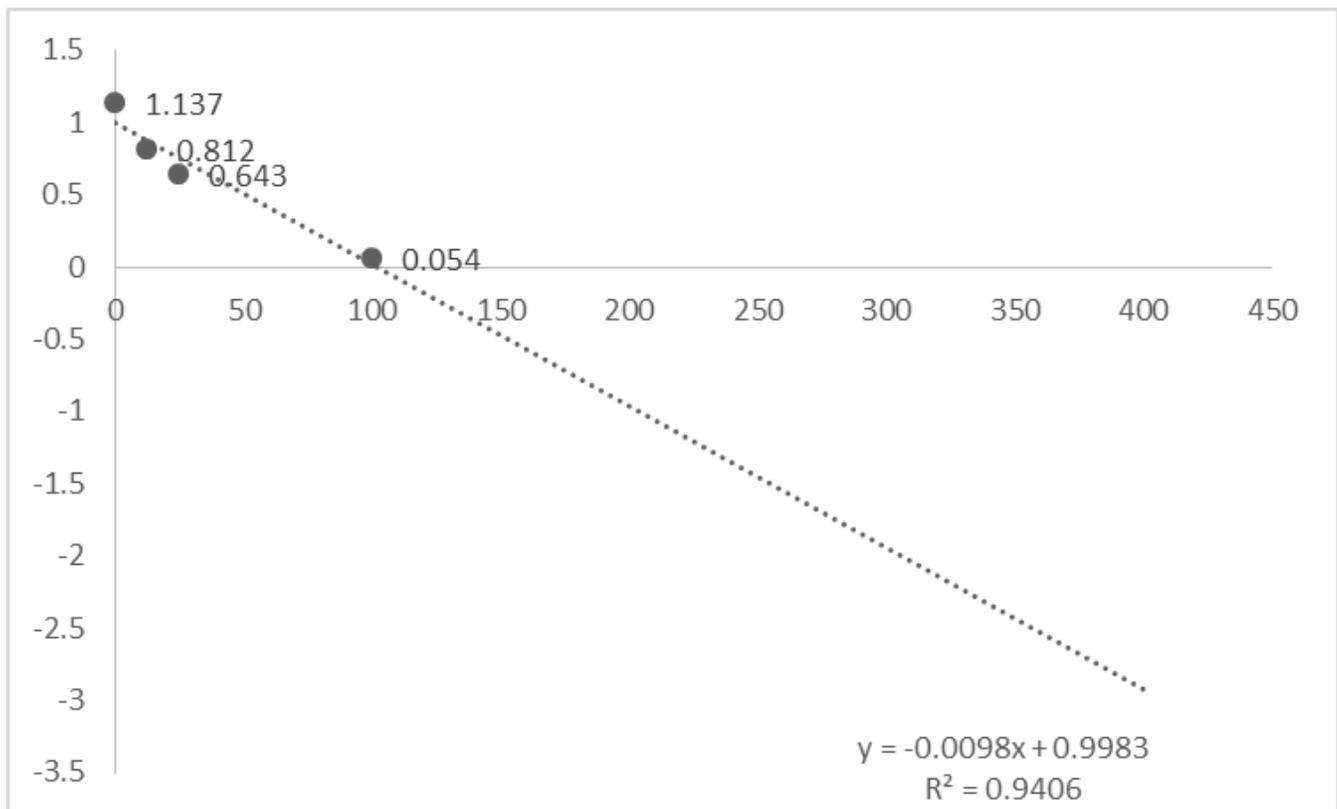
**Figura 25** Curva de calibración para fenoles totales equivalentes a ácido gálico ( $\mu\text{moles ác. gálico/g peso fresco}$ ).

## ANEXO B

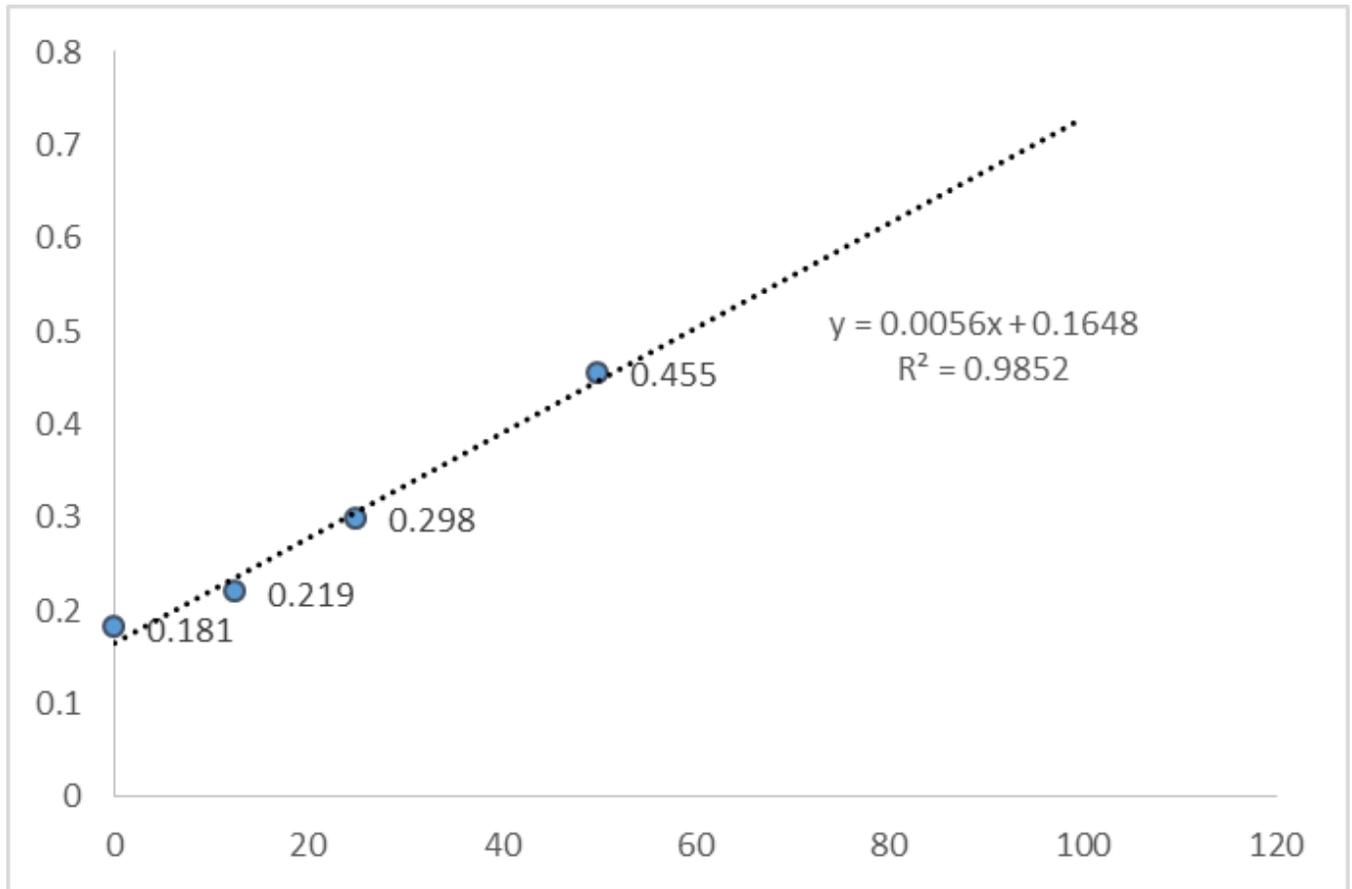
### Actividad antioxidante *in vitro*



**Figura 26** Curva de calibración de ensayo DPPH.



**Figura 27** Curva de calibración de ensayo ABTS+.



**Figura 28** Curva de calibración de ensayo FRAP.

## Tablas de supervivencia de *Artemia salina*

**Tabla xv** Supervivencia de *A. salina* en los extractos acuosos

Concentración	APP			APM		
	Tiempo (hrs)			Tiempo (hrs)		
[ µg/mL	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>24</b>
<b>0</b>	100	100	100	100	100	100
<b>10</b>	100	83.33	83.33	100	100	83.33
<b>20</b>	100	83.33	50	100	83.33	66.67
<b>40</b>	100	66.67	50	100	83.33	50
<b>80</b>	100	66.67	33.33	100	66.67	50
<b>R<sup>2</sup>=</b>	-	0.72	0.75	-	0.89	0.72

**Tabla xvi** Supervivencia de *A. salina* en los extractos acetónicos

Concentración	ACPM			ACPL		
	Tiempo (hrs)			Tiempo (hrs)		
[ µg/mL	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>24</b>
<b>0</b>	100	100	100	100	100	100
<b>10</b>	100	100	83.33	100	83.33	83.33
<b>20</b>	100	100	66.67	100	83.33	66.67
<b>40</b>	100	83.33	33.33	100	50.00	16.67
<b>80</b>	100	66.67	33.33	100	33.33	16.67
<b>R<sup>2</sup>=</b>		0.95	0.78		0.93	0.80

**Tabla xvii** Supervivencia de *A. salina* en los extractos metanólicos

Concentración	MPP			MPM		
	Tiempo (hrs)			Tiempo (hrs)		
[ µg/mL	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>24</b>
<b>0</b>	100	100	100	100	100	100
<b>10</b>	100	100	83.33	100	100.00	83.33
<b>20</b>	100	100	50.00	100	83.33	83.33
<b>40</b>	100	66.67	33.33	100	83.33	66.67
<b>80</b>	100	33.33	0.00	100	83.33	50.00
<b>R<sup>2</sup>=</b>		0.95	0.92		0.52	0.94

Concentración	MPL			MEP		
	Tiempo (hrs)			Tiempo (hrs)		
[ µg/mL	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>24</b>
<b>0</b>	100	100	100	100	100	100
<b>10</b>	100	100.00	83.33	100	100.00	66.67
<b>20</b>	100	83.33	66.67	100	100.00	50.00
<b>40</b>	100	83.33	50.00	100	83.33	33.33
<b>80</b>	100	66.67	33.33	100	16.67	0.00
<b>R<sup>2</sup>=</b>		0.89	0.90		0.90	0.91

## ANEXO C

### Medio de cultivo para CMI

Se utilizarán los medios AN y PDA, los cuales deben prepararse así:

1. Preparar el medio de acuerdo con las instrucciones de la casa manufacturadora.
2. Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C por 15 minutos.
3. Distribuir el medio en cantidad aproximada de 25 C.C. en cajas de Petrí de 15 x 150 ml, estériles.

Se debe dejar solidificar y mantenerlo luego a temperatura ambiente por un tiempo prudencial hasta que el exceso de humedad se evapore. Las cajas con el medio pueden incubarse por 30 minutos a 35°C. No debe haber gotas de agua de condensación sobre la superficie de medio o sobre la tapa de las cajas de Petrí.

## **ANEXO D**

Medios de cultivo para crecimiento de *C. elegans*

D1. Medio de crecimiento de nemátodos (NGM)

Cloruro de sodio (NaCl) 2 g/L

Peptona de caseína 4 g/L

Fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1M 3 g/L

Fosfato de potasio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 1M 0.5 g/L

\*Colesterol 1 mL

Agar 20 g/L

\*Colesterol en etanol a una concentración de 5 mg/mL

D2. Medio M9

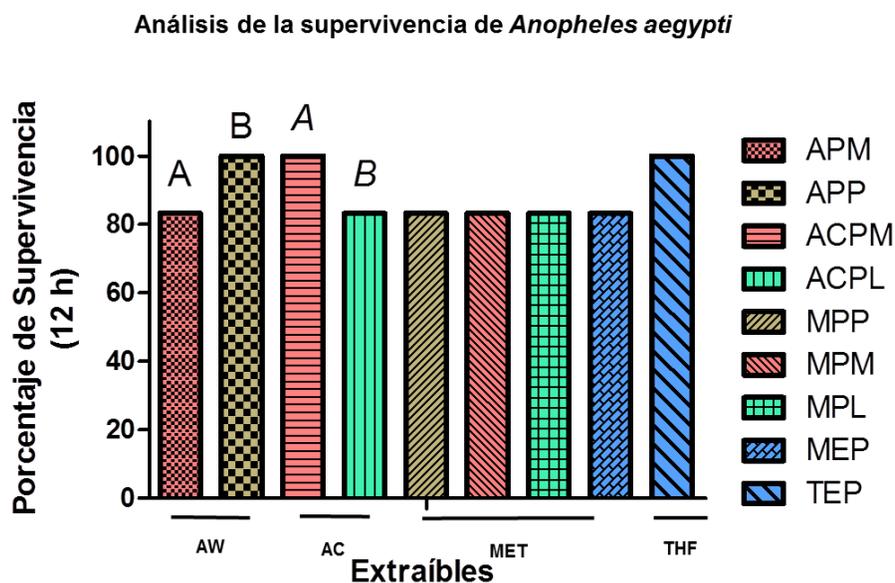
Fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1M 3 g/L

Fosfato de sodio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 1M 6 g/L

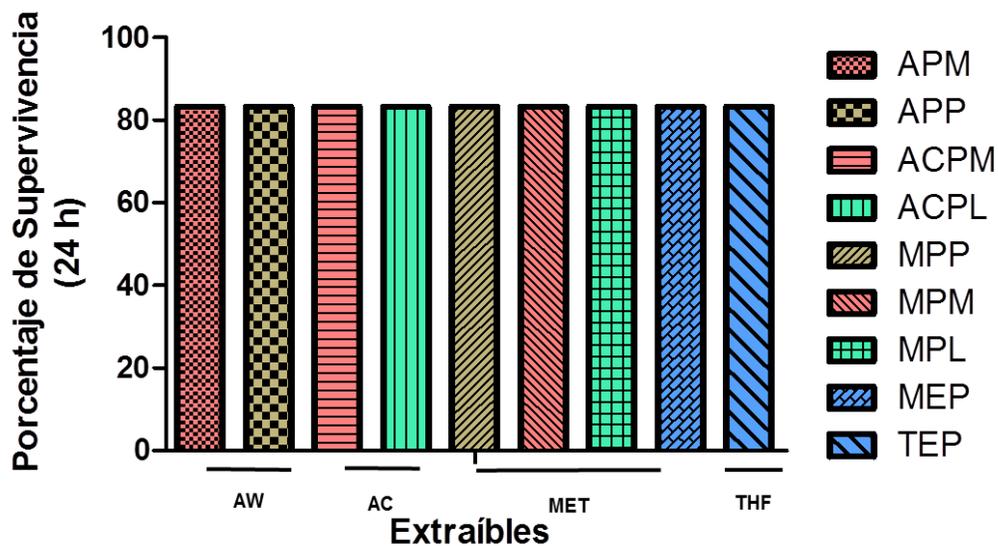
Cloruro de sodio (NaCl) 5 g/L

Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) 1M 1 mL

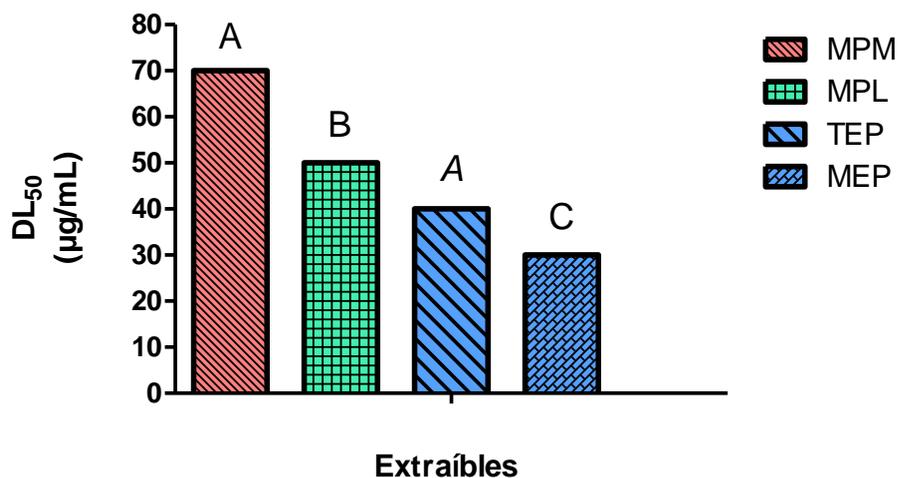
**Actividad insecticida de los extractos de las especies de *Pinus sp.* y *E. polystachya* en el modelo biológico *A. aegypti***



**Figura 29** Proporción promedio de la supervivencia de *A. aegypti* frente a la concentración de 100 µg/mL en los extractos de corteza de las tres especies de *Pinus sp.* y madera de la especie de *E. polystachya*. Cada valor es expresado con la media ± EE (n=6). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey. <sup>AB</sup>p<0.05 (APM vs APP), <sup>AB</sup>p<0.05 (ACPM vs ACPL).

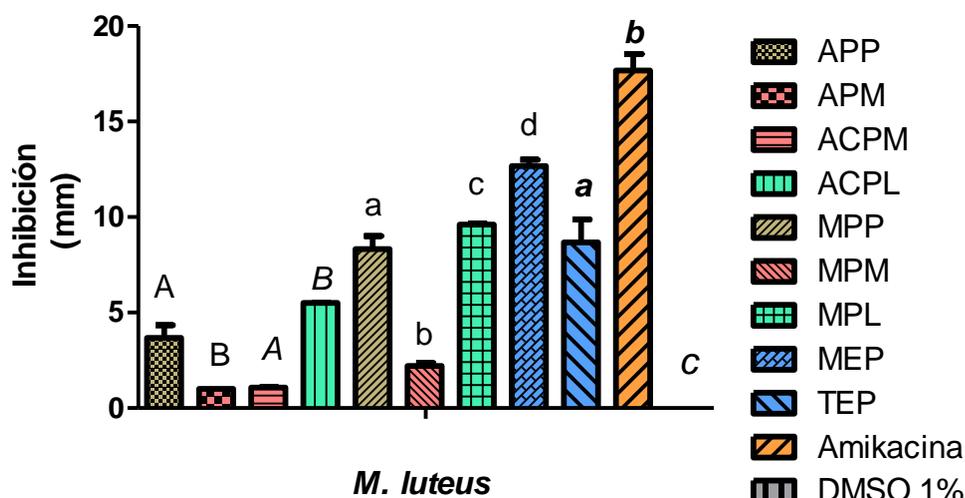


**Figura 30** Proporción promedio de la supervivencia de *A. aegypti* frente a la concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en los extractos de corteza de las tres especies de *Pinus sp.* y madera de la especie de *E. polystachya*. Cada valor es expresado con la media  $\pm$  EE (n=6). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey.

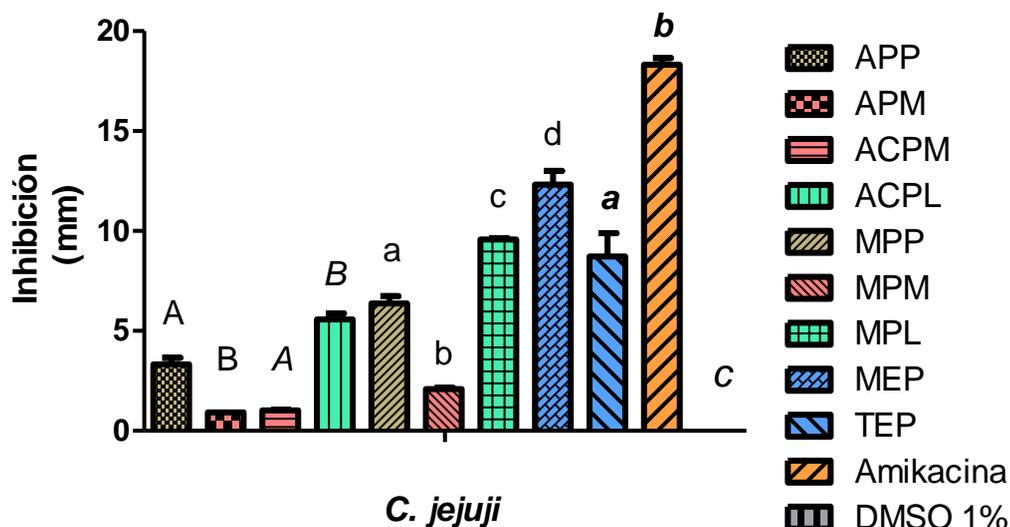


**Figura 31** Dosis Letal<sub>50</sub> de *A. salina* frente a la concentración de 70, 50, 40 y 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en los extractos de corteza de las tres especies de *Pinus sp.* y madera de la especie de *E. polystachya*. Cada valor es expresado con la media (n=6). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey. <sup>CAB</sup>p<0.05 (MEP vs MPM; MPL).

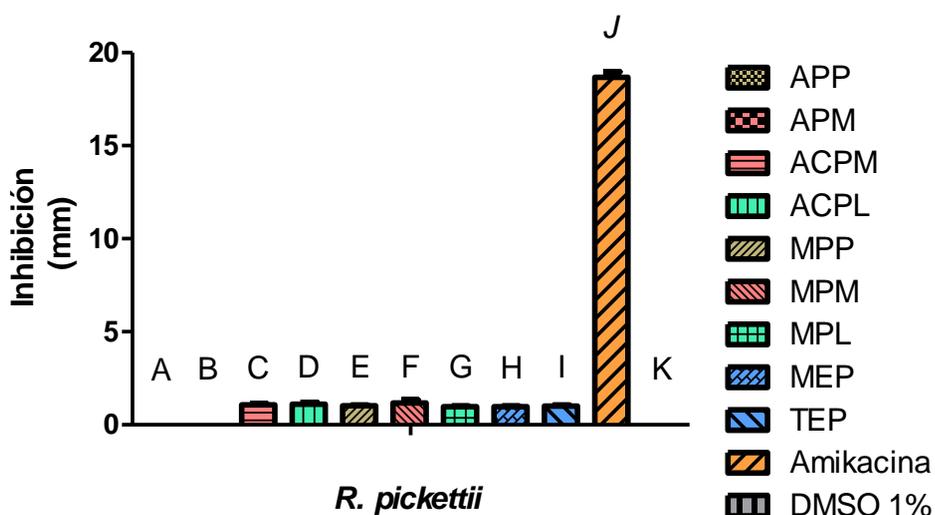
**Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de las especies de *Pinus sp.* y *E. polystachya* en una dosis de 400 µg**



**Figura 32** Amikacina fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Actividad antibacteriana de *M. luteus* frente a la concentración de 400 µg/mL en los extractos de corteza de las tres especies de *Pinus sp.* y madera de la especie de *E. polystachya*. Cada valor es expresado con la media ± EE (n=3). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey. <sup>bABABabcdap</sup><0.05 (Amikacina vs APP; APM; ACPM; ACPL; MPP; MPM; MPL; MEP; TEP; DMSO 1%), <sup>AB</sup>p<0.05 (APP vs APM), <sup>AB</sup>p<0.05 (ACPM vs ACPL), <sup>bacd</sup>p<0.05 (MPM vs MPP; MPL; MEP).

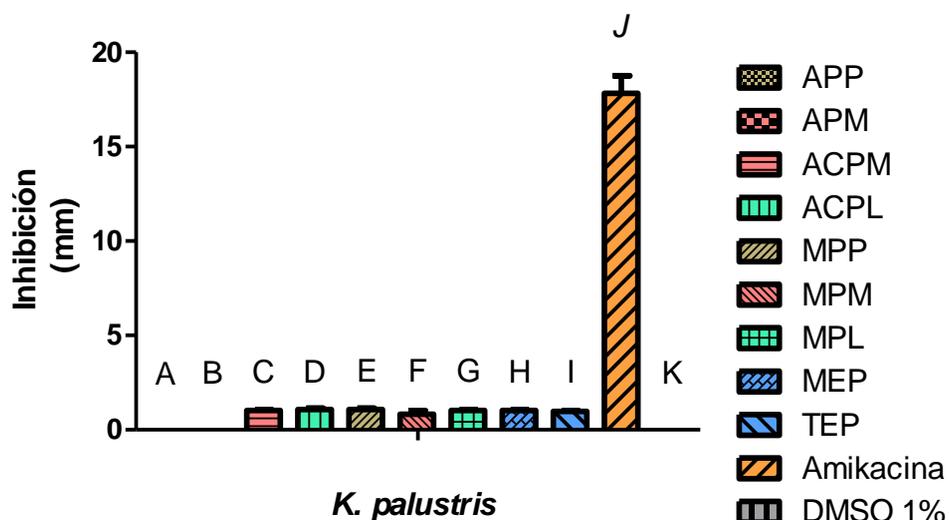


**Figura 33** Amikacina fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Actividad antibacteriana de *C.jejuni* frente a la concentración de 400 µg/mL en los extractos de corteza de las tres especies de *Pinus sp.* y madera de la especie de *E. polystachya*. Cada valor es expresado con la media ± EE (n=3). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey. <sup>bABABabcd</sup>p<0.05 (Amikacina vs APP; APM; ACPM; ACPL; MPP; MPM; MPL; MEP; TEP; DMSO 1%), <sup>AB</sup>p<0.05 (APP vs APM), <sup>AB</sup>p<0.05 (ACPM vs ACPL), <sup>abcd</sup>p<0.05 (MPM vs MPP; MPL; MEP).

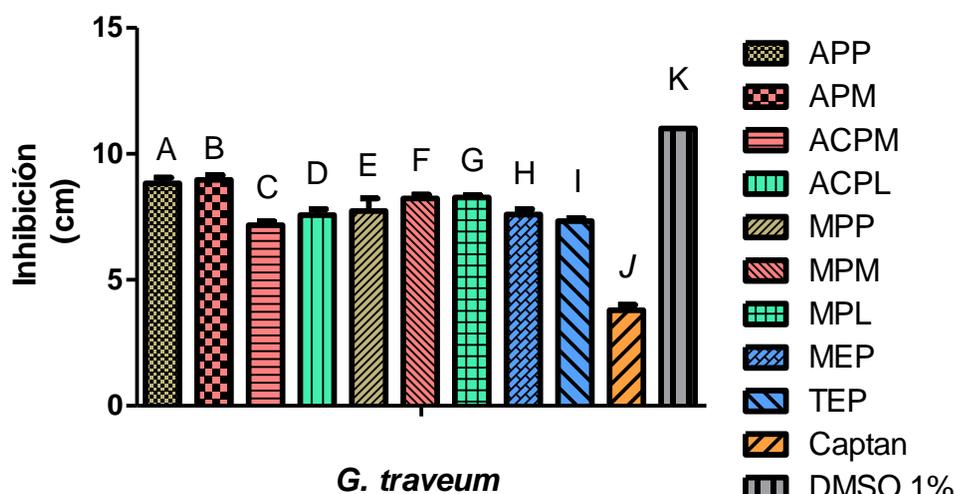


**Figura 34** Amikacina fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Actividad antibacteriana de *R. pickettii* frente a la concentración de 400 µg/mL en los extractos de corteza de las tres especies de *Pinus sp.* y madera de la especie de *E. polystachya*. Cada valor es expresado con la media ± EE (n=3). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey. <sup>JABCDEFGHIK</sup>p<0.05 (Amikacina vs APP; APM; ACPM; ACPL; MPP; MPM; MPL; MEP; TEP; DMSO 1%).

**Medición del efecto antifúngico de los extractos de *Pinus sp.* y *E. polystachya***



**Figura 35** Captan fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Actividad antibacteriana de *K. palustris* frente a la concentración de 400 µg/mL en los extractos de corteza de las tres especies de *Pinus sp.* y madera de la especie de *E. polystachya*. Cada valor es expresado con la media ± EE (n=3). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey. <sup>JABCDEFGHIK</sup>p<0.05 (Amikacina vs APP; APM; ACPM; ACPL; MPP; MPM; MPL; MEP; TEP; DMSO 1%).



**Figura 36** Captan fue usado como control positivo y como control negativo se usó el solvente DMSO al 1 %. Actividad antibacteriana de *G. traveum* frente a la concentración de 400 µg/mL en los extractos de corteza de las tres especies de *Pinus sp.* y madera de la especie de *E. polystachya*. Cada valor es expresado con la media ± EE (n=3). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA Tukey. <sup>JABCDEFGHIK</sup>p<0.05 (Amikacina vs APP; APM; ACPM; ACPL; MPP; MPM; MPL; MEP; TEP; DMSO 1%).

## ANEXO E. PERFIL DE COMPUESTOS POR RMN

