



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



CENTRO DE INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL UNIDAD DURANGO

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN NUTRACÉUTICA DE EXTRACTOS POLIFENÓLICOS DE CORTEZA
DE *Pinus durangensis* Y *Quercus sideroxylla* Y SU EFECTO HIPOGLUCÉMICO E
HIPOCOLESTEROLÉMICO EN MODELO MURINO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

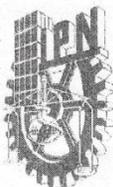
M. en C. Marcela Soto García

DIRECTORAS DE TESIS:

Dra. Martha Rosales Castro

Dra. Norma Paniagua Castro

Victoria de Durango, Durango, Junio de 2017



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 04 de noviembre del 2016

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN Durango en su sesión ordinaria No. 10 celebrada el día 04 del mes de Noviembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<u>SOTO</u>	<u>GARCÍA</u>	<u>MARCELA</u>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)

Con registro:

B	1	3	0	6	0	0
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Evaluación nutracéutica de extractos polifenólicos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*, y su efecto hipoglucémico e hipocolesterolémico en modelo murino

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

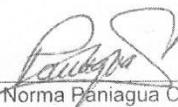
2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dra. Martha Rosales Castro y Dra. Norma Paniagua Castro

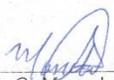
3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
El CIIDIR-IPN Unidad Durango
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

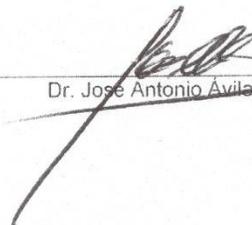
4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

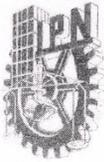
Directores de Tesis


 Dra. Martha Rosales Castro
 Aspirante


 Dra. Norma Paniagua Castro
 Presidente del Colegio


 M. en C. Marcela Soto García


 Dr. José Antonio Avila Reyes
 CENTRO INTERDISCIPLINARIO
 DE INVESTIGACIÓN PARA EL
 DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
 C.I.I.D.I.R
 UNIDAD DURANGO
 I.P.N.



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 17:00 horas del día 06 del mes de junio del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del: CIIDIR-IPN Unidad Durango para examinar la tesis titulada:

Evaluación nutracéutica de extractos polifenólicos de corteza de Pinus durangensis y Quercus sideroxyla, y su efecto hipoglucémico e hipocolesterolémico en modelo murino

Presentada por la alumna:

SOTO	GARCÍA	MARCELA
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
		Con registro: B 1 3 0 6 0 0

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

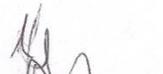
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

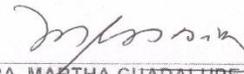
LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


DRA. MARTHA ROSALES CASTRO

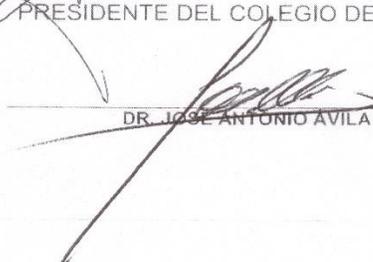

DRA. NORMA PANIAGUA CASTRO


DRA. YOLANDA HERRERA ARRIETA


DRA. MARTHA GUADALUPE SOSA MACÍAS


DR. CARLOS GALAVIZ HERNÁNDEZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DR. JOSÉ ANTONIO ÁVILA REYES



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Durango, Dgo., el día **06** del mes de **junio** del año **2017** la que suscribe **Marcela Soto García** alumna del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**, con número de registro **B130600**, adscrita al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. CIIDIR-IPN Unidad Durango**, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Martha Rosales Castro** y de la **Dra. Norma Paniagua Castro** y cede los derechos del trabajo titulado “Evaluación nutracéutica de extractos polifenólicos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*, y su efecto hipoglucémico e hipocolesterolémico en modelo murino”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones marce.sotog@gmail.com, mrciidirdgo@yahoo.com y npaniag@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


MARCELA SOTO GARCÍA



El presente trabajo de investigación cuyo título es “Evaluación nutracéutica de extractos polifenólicos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla* y su efecto hipoglucémico e hipocolesterolémico en modelo murino”, se realizó en el laboratorio de fitoquímica del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN) Unidad Durango y en la facultad de farmacia de Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, bajo la dirección de las Doctoras Martha Rosales Castro y Norma Paniagua Castro. Se recibió apoyo de CONACYT, mediante la asignación de la beca escolar 368494. Esta investigación formó parte de los proyectos SIP-IPN 20140428, 20150338 y 20160498.

Parte del trabajo experimental fue realizado en el laboratorio de cultivo vegetal del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey campus Guadalajara en Zapopan, Jalisco, con el apoyo de la Dra. María José Rivas Arreola y en la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, bajo la supervisión del Dr. José Rubén García Sánchez.

A veces sentimos que lo que hacemos es tan sólo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota...

Santa Teresa de Calcuta

Dedicatoria

A mis hijas, que son mi todo... Sarah y Sofía

*A mi compañero de vida, quien es mi constante en este mundo de
infinitas variables...*

A quienes debo lo mejor de mí, mis padres...

A mis ángeles que sé me miran desde las estrellas...

ÍNDICE

Sección	Página
Glosario	i
Lista de acrónimos	ii
Lista de figuras	iii
Lista de cuadros	v
Resumen	vi
Abstract	viii
1 Introducción	1
2 Antecedentes	3
2.1 Alimentos funcionales y Nutraceuticos	3
2.2 Nutraceuticos: clasificación y características	3
2.3 Nutraceuticos antioxidantes	5
2.4 Nutraceuticos: polifenoles	6
2.4.1 Flavonoides	9
2.5 Nutraceuticos y Estrés oxidativo	11
2.5.1 Nutraceuticos y la diabetes mellitus	13
2.5.2 Nutraceuticos en hipercolesterolemia	16
2.6 Ensayos toxicológicos de nutraceuticos	18
2.7 Especies vegetales con potencial nutraceutico	19
2.7.1 Descripción de <i>P. durangensis</i> Martínez	20
2.7.2 Descripción de <i>Q. sideroxylla</i> Humb & Bonpl	21
3 Justificación	23
4 Hipótesis	23
5 Objetivos	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos	24
6 Materiales y Métodos	25
6.1 Materiales	25
6.1.1 Colecta de la corteza de las especies de estudio	25

6.2	Métodos	25
6.2.1	Obtención de extractos crudos y orgánicos de las cortezas de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxylla</i> ; y la evaluación de la concentración de polifenoles.	25
6.2.1.1	Obtención de extractos para definir las mejores condiciones de extracción	27
6.2.1.2	Extractos crudos (EC)	27
6.2.1.3	Extractos orgánicos (EO)	27
6.2.1.4	Determinación de rendimientos y/o contenido de sólidos	28
6.2.1.5	Determinación del contenido fenólico	28
6.2.1.6	Determinación del contenido de flavonoides	28
6.2.1.7	Determinación del contenido de proantocianidinas	29
6.2.2	Identificación de los principales polifenoles en los extractos para verificar la reproducción de éstos en las especies	29
6.2.2.1	Identificación de metabolitos mediante HPLC-UV	29
6.2.2.2	Identificación de metabolitos mediante HPLC-ESI-MS	30
6.2.3	Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos con métodos <i>in vitro</i> y mediante el método de lipoperoxidación <i>in vivo</i>	30
6.2.3.1	Evaluación de la capacidad antioxidante mediante DPPH	30
6.2.3.2	Evaluación de capacidad antioxidante mediante ABTS	31
6.2.3.3	Evaluación de capacidad antioxidante mediante FRAP	31
6.2.3.4	Evaluación antioxidante mediante la prueba de lipoperoxidación hepática <i>in vivo</i>	32
6.2.4	Evaluación del efecto hipoglucemiante e hipocolesterolemiante en modelo murino; y la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa	32
6.2.4.1	Inhibición de la α -amilasa <i>in vitro</i>	32
6.2.4.2	Inhibición de la α -glucosidasa <i>in vitro</i>	33
6.2.4.3	Animales	34
6.2.4.4	Evaluación de la actividad hipoglucemiante	34

6.2.4.5	Evaluación del efecto hipoglucemiante	36
6.2.4.6	Evaluación de la actividad hipocolesterolemiantes en modelo murino	36
6.2.5	Evaluación del efecto toxicológico, citotóxico y genotóxico de los extractos	37
6.2.5.1	Evaluación de dosis letal media (DL ₅₀)	37
6.2.5.2	Evaluación citotóxica	37
6.2.5.3	Evaluación genotóxica	39
7	Análisis estadístico	41
8	Resultados	42
8.1	Obtención de extractos crudos y orgánicos de las cortezas de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxylla</i> ; y la evaluación de la concentración de polifenoles	42
8.1.1	Evaluación de extractos	42
8.1.2	Evaluación de extractos crudos y orgánicos de las cortezas de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxylla</i> aplicando las mejores condiciones de extracción	47
8.2	Identificación de los principales polifenoles en los extractos para verificar la reproducibilidad de éstos en las especies	48
8.2.1	Identificación de metabolitos mediante HPLC-UV	48
8.2.2	Identificación de metabolitos mediante HPLC-ESI-MS	51
8.3	Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos con métodos <i>in vitro</i> y mediante el método de lipoperoxidación hepática <i>in vivo</i>	54
8.3.1	Evaluación antioxidante <i>in vitro</i>	54
8.3.2	Evaluación antioxidante <i>in vitro</i>	55
8.4	Evaluación del efecto hipoglucemiante e hipocolesterolemiantes en modelo murino; y la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa <i>in vitro</i>	56
8.4.1	Evaluación de la inhibición de la enzima α -amilasa <i>in vitro</i>	56
8.4.2	Evaluación de la inhibición de la enzima α -glucosidasa <i>in vitro</i>	58

8.4.3	Evaluación del efecto hipoglucemiante <i>in vivo</i>	59
8.4.3.1	Actividad hipoglucemiante	59
8.4.3.2	Efecto hipoglucemiante en un modelo murino con diabetes inducida	61
8.4.4	Evaluación del efecto hipocolesterolemiante en modelo murino	62
8.5	Evaluación toxicológica	64
8.5.1	Determinación de DL ₅₀	64
8.5.2	Evaluación citotóxica	64
8.5.3	Evaluación genotóxica	67
9	Discusión	69
9.1	Obtención y evaluación de extractos de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxylla</i>	69
9.1.1	Evaluación de extractos	66
9.1.2	Evaluación de EC y EO de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxylla</i>	69
9.2	Identificación de los principales polifenoles en los extractos para verificar la reproducibilidad de éstos en las especies	73
9.2.1	Identificación por HPLC-UV	73
9.2.2	Identificación por HPLC-ESI-MS	74
9.3	Evaluación de capacidad antioxidante de extractos con métodos <i>in vitro</i> y mediante el método de lipoperoxidación hepática <i>in vivo</i>	75
9.4	Evaluación del efecto hipoglucemiante e hipocolesterolemiante en modelo murino; y la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa <i>in vitro</i>	77
9.4.1	Evaluación de la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa	77
9.4.2	Evaluación de la actividad y efecto hipoglucemiante	78
9.4.3	Evaluación del efecto hipocolesterolemiante	80
9.5	Evaluación toxicológica	81
9.5.1	Determinación de DL ₅₀	81
9.5.2	Evaluación citotóxica	82

9.5.3	Evaluación genotóxica	83
10	Conclusiones	85
11	Recomendaciones	87
12	Referencias	88
	Agradecimientos	100
	Anexo A	102
	Anexo B	118

GLOSARIO

Especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species): son un conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno. Las ROS son moléculas muy reactivas entre las que se encuentran los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de óxido-reducción.

Lipoperoxidación lipídica: proceso que hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos, a través del cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares.

Hiperglucemia postprandial: se refiere a un marcado aumento en los niveles de glucosa en la sangre después de una comida. Se observa con mayor frecuencia en personas con diabetes mellitus tipo 2 y puede estar relacionado con un mayor riesgo de complicaciones cardiovasculares.

Bik: proteína del grupo BH3-only considerada como una proteína sensora pro-apoptótica.

p53: es una fosfoproteína que se localiza en el núcleo celular. Se considera como una proteína supresora de tumores que ejerce su función uniéndose al ADN y regula la expresión de distintos genes.

LISTA DE ACRÓNIMOS

SOD	Superóxido dismutasa
CAT	Catalasa
GPx	Glutati3n peroxidasa
M:S	Relaci3n masa-solvente
EC	Extractos crudos
EO	Extractos orgánicos
Ec.	Ecuaci3n
ppm	Partes por mill3n
ARL	Atrapamiento de radicales libres
mM	Mili molar
CE ₅₀	Concentraci3n efectiva media
NOM	Norma oficial mexicana
FT	Fenoles totales
FL	Flavonoides
PACS	Proantocianidinas
rpm	Revoluciones por minuto
CT	Colesterol total
TGC	Triglicéridos
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
CPA	Ciclofosfamida
ADN	Ácido desoxirribonucleico
SD	Desviaci3n estándar
HPLC-UV	Cromatografía de líquidos de alta resoluci3n con detector ultravioleta
HPLC-ESI-MS	Cromatografía de líquidos de alta resoluci3n con detector de ionizaci3n por electrospray acoplado a masas.
PdEC	Extracto crudo de <i>P. durangensis</i>
PdEO	Extracto orgánico de <i>P. durangensis</i>
QsEC	Extracto crudo de <i>Q. sideroxyla</i>
QsEO	Extracto orgánico de <i>Q. sideroxyla</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Clasificación de polifenoles	8
2	Estructura básica de un flavonoide	9
3	<i>Pinus durangensis</i> Martínez	21
4	<i>Quercus sideroxyla</i> Humb. & Bonpl	22
5	Diagrama de flujo de la primera etapa experimental: obtención y caracterización de extractos polifenólicos	26
6	Contenido fenólico de extractos preliminares de <i>P. durangensis</i> (a) y <i>Q. sideroxyla</i> (b)	43
7	Contenido de flavonoides y proantocianidinas en extractos de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxyla</i> obtenidos en los diferentes tratamientos de extracción	44
8	Evaluación polifenólica de extractos crudos y orgánicos de corteza de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxyla</i>	47
9	Cromatograma de HPLC a 250 nm de extractos de corteza de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxyla</i> , y espectros UV de picos de mayor intensidad	49
10	Cromatograma de iones totales de extractos orgánicos de <i>P. durangensis</i> (A) y <i>Q. sideroxyla</i> (B)	51
11	CE ₅₀ del efecto inhibitorio de EC y EO de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxyla</i> sobre la enzima α -amilasa	57
12	CE ₅₀ del efecto inhibitorio de EC y EO orgánicos de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxyla</i> sobre la enzima α -glucosidasa	58
13	Curva de tolerancia a la glucosa de EC y EO de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxyla</i>	59
14	Resultados de la evaluación de efecto hipocolesterolemizante de EC y EO de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxyla</i>	63

15	Efecto de extractos de corteza de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxyla</i> sobre la viabilidad celular: (A) HeLa, (B) MDA-MB-231, (C) HSF-1184, (D) MCF-10A	65
16	Imágenes del daño al DNA en células de ratón (400 x) (ensayo cometa).	68

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Fármacos convencionales y nutracéuticos en el tratamiento de la diabetes	15
2	Rendimiento de sólidos y capacidad antioxidante de las cortezas de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxylla</i>	46
3	Tiempos de retención de los compuestos determinados por HPLC-UV de extractos hidroetanólicos de las cortezas de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxylla</i>	50
4	Compuestos identificados por HPLC-ESI-MS en EO de <i>P. durangensis</i>	52
5	Compuestos identificados por HPLC-ESI-MS en EO de <i>Q. sideroxylla</i>	53
6	Evaluación antioxidante <i>in vitro</i> de EC y EO de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxylla</i>	54
7	Evaluación antioxidante <i>in vivo</i> de EC y EO de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxylla</i>	55
8	Área bajo la curva de extractos de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxylla</i>	60
9	Niveles de glucemia en ratas Wistar durante el tiempo de estudio	61
10	Evaluación de dosis letal ₅₀ y signos tóxicos	64
11	CE ₅₀ de EC y EO de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxylla</i> sobre líneas celulares de cáncer de mama, cérvix y no tumorales	66
12	Evaluación genotóxica de extractos crudos de <i>P. durangensis</i> y <i>Q. sideroxylla</i>	67

RESUMEN

En la búsqueda de compuestos bioactivos de las plantas, la corteza de especies maderables es un subproducto promisorio, ya que contiene compuestos fenólicos de interés terapéutico. *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxyla* son algunas de las especies maderables que han sido reportadas como fuente potencial de nutraceuticos; sin embargo el estudio de sus propiedades farmacológicas era limitado. En el presente trabajo se evaluó el efecto nutraceutico de extractos polifenolicos de corteza de *P. durangensis* y *Q. sideroxyla* sobre hiperglucemia e hipercolesterolemia desarrollada en modelo murino, así como también su posible efecto toxicológico. Se inició con el estudio del efecto del solvente (etanol-agua al: 20, 50 y 80%) y la relación masa: solvente (1:10, 1:20, 1:30) sobre la extracción de compuestos bioactivos, y se determinó que el solvente al 50% para ambas especies; y la relación masa: solvente de 1:30 y 1:10 para *P. durangensis* y *Q. sideroxyla*, respectivamente fueron las mejores condiciones de extracción. Con estas condiciones se obtuvieron extractos crudos (EC), y mediante una fraccionación líquido-líquido con acetato de etilo se obtuvieron extractos y orgánicos (EO). A éstos extractos se les evaluó la concentración de fenoles totales (FT), flavonoides (FL) y proantocianidinas (PACS), siendo los extractos orgánicos los que presentaron una mayor concentración de FT. La evaluación de actividad antioxidante de los extractos, se evaluó con técnicas *in vitro*: ABTS, DPPH y FRAP; y técnicas *in vivo* mediante la evaluación de lipoperoxidación hepática. En todas estas técnicas se corroboró su potencial antioxidante. En la evaluación de las propiedades biológicas determinadas *in vitro*, mediante la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, se obtuvo una mayor inhibición de los extractos en comparación al control acarbossa.

En la evaluación de efecto hipoglucemiante de los extractos en modelo murino, se obtuvo una mejor respuesta por parte de los extractos orgánicos; lo cual se replicó en los resultados obtenidos de la evaluación hipocolesterolemiantes desarrollada en el modelo murino.

Respecto a la evaluación toxicológica de extractos, se encontró que éstos no producen mortalidad ni efectos tóxicos a dosis \geq de 5000 mg/kg, además de presentar

selectividad celular dosis-dependiente durante la evaluación citotóxica en células tumorales y no tumorales (MDA-MB-231, HeLa, MCF-10A y HSF 1184). De su efecto genotóxico ambas especies mostraron ligera genotoxicidad al generar cometas tipo 1 a las 24 h, a dosis de 200 mg/kg.

La identificación y reproducibilidad de compuestos bioactivos de los extractos de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* se comprobó mediante HPLC-DAD y HPLC-ESI-MS.

Los resultados obtenidos de este trabajo de investigación demostraron que los extractos de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* poseen efectos positivos en las patologías desarrolladas en los modelos murinos, principalmente en hiperglucemia. Los resultados de la evaluación de los efectos tóxicos, citotóxicos y genotóxicos reafirman el gran potencial nutracéutico que representan ambas especies.

ABSTRACT

In the search for bioactive compounds of plants, the bark of timber species is a promising byproduct, as it contains phenolic compounds of therapeutic interest. *Pinus durangensis* and *Quercus sideroxylla* are some of the wood species that have been reported as a potential source of nutraceuticals; however the study of its pharmacological properties was still limited. In the present work the nutraceutical effect of *P. durangensis* and *Q. sideroxylla* polyphenolic bark extracts on hyperglycemia and hypercholesterolemia developed in murine model, were evaluated, as well as its possible toxicological effect. It was started with the study of the solvent effect (ethanol-water at: 20, 50 and 80%) and mass: solvent ratio (1:10, 1:20, 1:30) on the extraction of bioactive compounds, where it was determined the solvent at 50% for both species and ratio mass: solvent 1:20 and 1:30 *P. durangensis* and *Q. sideroxylla* respectively, were the best extraction conditions. With these conditions crude (CE) and organic (OE) extracts obtained by a liquid-liquid extraction with ethyl acetate and later phenolic characterization was performed by quantification of total phenolic compounds (FT), flavonoids (FL) and proanthocyanidins (PACS). Organic extracts showed a higher FT concentration. The evaluation of antioxidant activity of the extracts was evaluated using *in vitro* techniques: ABTS, DPPH and FRAP; and *in vivo* techniques by evaluating lipid peroxidation. In all these techniques its antioxidant potential was corroborated. Biological properties were initially determined *in vitro* by the inhibition of α -amylase and α -glucosidase enzymes, where greater inhibition by the extracts was obtained as compared to acarbose control. Subsequently, the hypoglycemic effect of murine extracts was evaluated, where a better response was obtained from the organic extracts; which was replicated in the results obtained from the hypocholesterolemic evaluation developed in murine.

Regarding the toxicological evaluation of extracts, it was found that they did not produce mortality or toxic effects at doses ≥ 5000 mg / kg, in addition to presenting dose-dependent cellular selectivity during cytotoxic evaluation in tumor and non-tumor cells (MDA-MB- 231, HeLa, MCF-10A and HSF 1184). From their genotoxic effect, both

species showed slight genotoxicity when generating type 1 comet at 24 h at doses of 200 mg / kg.

Identification and reproducibility of bioactive compounds from extracts of *P. durangensis* and *Q. sideroxylo* was checked by HPLC-DAD-MS.

The results obtained from this research showed that the extracts of *P. durangensis* and *Q. sideroxylo* have positive effects in the pathologies developed in the murine models, mainly in hyperglycemia. The results of the evaluation of toxic, cytotoxic and genotoxic effects reaffirm the great nutraceutical potential of both species.

1. INTRODUCCIÓN

Los nutraceuticos son productos que contienen un compuesto bioactivo en cantidades excedentes a su fuente original y que ejercen efectos benéficos a la salud (Larussa *et al.*, 2017). Dentro de ellos se sitúan a los polifenoles a quienes podemos encontrar en diversas fuentes de origen vegetal y cuya acción benéfica se ha reportado sobre diversas enfermedades crónico degenerativas (Martínez-Abundis *et al.*, 2016; Del río *et al.*, 2013).

Existe la evidencia de que ciertos compuestos de origen fenólico poseen propiedades hipoglucemiantes e hipocolesterolemiantes, así como también incidencia positiva sobre patologías asociadas al estrés oxidativo; por tanto se considera que los extractos derivados de fuentes vegetales pueden ayudar de manera eficaz a problemas de salud asociadas con daño oxidativo (Zhang & Tsao 2016).

Actualmente, muchos investigadores centran sus estudios en la detección, análisis y cuantificación de metabolitos polifenólicos en diferentes tipos de especies vegetales, debido al auge que está experimentando la incorporación de sustancias de origen natural en la formulación de productos con aplicaciones clínicas e industriales (Rana & Bhushan, 2016; Martins *et al.*, 2014; Aguilar-López *et al.*, 2012). Es por ello que se ha suscitado un creciente interés en el estudio sistemático de compuestos polifenólicos presentes en la flora nacional, principalmente en la corteza de ciertas especies maderables, con el fin de dar una utilidad a los residuos generados durante las operaciones de aserrío de especies que actualmente no se aprovechan en su totalidad (Aguilar-López *et al.*, 2012).

Los extractos de corteza de las especies maderables por naturaleza tienen una gran concentración de compuestos fenólicos (Rosales-Castro *et al.*, 2009; Rosales-Castro, *et al.*, 2012; Rosales-Castro *et al.*, 2017), y presentan gran potencial antioxidante, el cual se ha reportado como el mecanismo que incide sobre desórdenes asociados al desequilibrio redox (Pisoschi & Pop 2015). Por ello se considera que los compuestos bioactivos obtenidos de las cortezas pueden representar una rica fuente de nutraceuticos con probable aplicación biofarmacológica (Li *et al.*, 2015).

P. durangensis y *Q. sideroxylla* son especies endémicas de México, con gran presencia en el estado de Durango, cuyo uso principal es destinado a la obtención de madera de alta calidad, por ende son las especies de mayor explotación en el estado. Los subproductos forestales como la corteza no reciben un valor comercial ni maderable, lo que conlleva al cúmulo y desperdicio de fuente potencial para la generación de productos nutraceuticos (Cruz-Contreras, 2012).

En este trabajo se propone la valoración nutraceutica de la corteza del pino *P. durangensis* Martínez y del encino *Q. sideroxylla* Humb. & Bonpl como fuente de compuestos bioactivos (polifenoles); para ello se realizó en primer término la obtención de los extractos, aplicando como variables el solvente y la relación masa: solvente, con el fin de encontrar las mejores condiciones de extracción, considerando como parámetros de respuesta el rendimiento, la concentración fenólica y la actividad antioxidante.

A partir de los extractos se efectuó una valoración toxicológica mediante la dosis letal media, efecto citotóxico y genotóxico.

Dentro de la investigación de sus propiedades biológicas se evaluó su efecto sobre hiperglucemia e hipercolesterolemia, que son enfermedades que propician graves problemas de salud pública.

El análisis de identificación y reproducibilidad de metabolitos bioactivos presentes en extractos de corteza de ambas especies de estudio refuerzan el potencial nutraceutico de las especies.

El conocimiento generado a partir de productos de bajo valor comercial como lo es la corteza, podría marcar la pauta para sentar el valor agregado y generar productos con aplicación nutraceutica.

2. ANTECEDENTES

2.1 Alimentos funcionales y Nutraceuticos

El ser humano ha desarrollado una particular sensibilidad frente a la posible correlación entre su estado de salud y los alimentos que consume. Esto como resultado de estudios epidemiológicos recientes, en donde se ha establecido una dependencia entre el consumo de frutas y vegetales; y la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas (Huang *et al.*, 2005). Esta fue descrita por Hipócrates (460-377 A.C.), quien enunció: “Deja que tu alimento sea tu medicina y la medicina sea tu alimento” para establecer la relación entre los alimentos adecuados para la salud y sus beneficios terapéuticos.

De acuerdo a la problemática que deriva del nuevo estilo de vida y la creciente preocupación por el vínculo alimentación-estado de salud es como surgen los alimentos funcionales y nutraceuticos, cuya tendencia en consumo va en incremento (Pandey *et al.*, 2010).

Como definición, los alimentos funcionales son alimentos que tienen un efecto potencialmente positivo sobre la salud más allá de la nutrición básica, ayudando a promover condiciones óptimas de salud y reduciendo el riesgo de enfermedades no transmisibles. El efecto preventivo o de tratamiento se encuentra modulado por la acción de compuestos químicos llamados compuestos bioactivos. Éstos son componentes extra-nutricionales que se encuentran en pequeñas cantidades en algunos alimentos y que, al modular funciones específicas de órganos, pueden tener actividad biológica dentro del organismo dando lugar a efectos fisiológicos beneficiosos. Esta posible actividad biológica ha sido aplicada por las compañías farmacéuticas para aumentar el arsenal terapéutico disponible y recientemente por la industria alimentaria como alimentos funcionales o nutraceuticos (Gil *et al.*, 2015).

2.2 Nutraceuticos: clasificación y características

El término 'nutraceutico' fue originado por la combinación de los términos 'nutrición' y farmacéutico ' de Stephen Defelice MD, fundador y presidente de la innovación en medicina, Nueva Jersey, en 1989. Se definen como aquellos compuestos que

proporcionan una forma concentrada de un agente presumiblemente bioactivo de un alimento, presentado en una matriz no alimenticia y utilizado para incrementar la salud en dosis que exceden aquellas que pudieran ser obtenidas del alimento normal (Pandey *et al.*, 2010). Su efecto benéfico va desde una capacidad preventiva y/o terapéutica definida, debido a esto la prevención de enfermedades en base a la dieta diaria e ingesta de nutraceuticos es vista cada vez más como una opción. Esto ha originado el desarrollo de productos diseñados para cubrir necesidades de salud cada vez más específicas, siendo éstos comúnmente comercializados en forma de píldoras, pastillas, cápsulas o tónicos, cuyos componentes o sustancias nutraceuticas pueden ser liberados en la forma del alimento o como un suplemento dietario, o en ambas formas (Ho *et al.*, 2002).

Al hablar de nutraceuticos se habla de una medicina biológica y de una categoría amplia de productos que deben cumplir los siguientes criterios:

- Ser productos de origen natural
- Aislados y purificados por métodos no desnaturizantes
- Que aporten efectos benéficos a la salud: mejora y/ prevención
- Con análisis toxicológicos, y químicos
- Estudios reproducibles de sus compuestos bioactivos, que aporten reproducibilidad, calidad, seguridad y eficacia.
- Investigación y desarrollo con los métodos más avanzados
- Estudios en animales de experimentación y en humanos.

(Shoji & Nakashima, 2004)

La clasificación de nutraceuticos se realiza generalmente de acuerdo a su origen y a su potencialidad nutraceutica. De acuerdo a su origen su clasificación es:

Animal

Vegetal

Microbiana

Mineral

(Chauhan *et al.*, 2013).

Aunque algunas de las formas más comunes de clasificar a los nutraceuticos pueden basarse en la fuente alimenticia, mecanismo de acción, naturaleza química, etc. Las fuentes de alimentos utilizadas como nutraceuticos son todas naturales y pueden clasificarse como:

- Probiótico
- Prebiótico
- Fibra dietaria
- Omega 3, ácidos grasos y fosfolípidos
- Inulina y oligofructanos
- Antioxidantes

(Vattem & Maitin 2015; Pandey *et al.*, 2010).

De acuerdo a su potencialidad como nutraceutico se deben considerar las siguientes maneras:

- Potenciales nutraceuticos
- Nutraceuticos establecidos

Un potencial nutraceutico es aquel que tiene una promesa de un beneficio particular de salud o médica; tal nutraceutico potencial sólo se convierte en un establecido después de que haya suficientes datos clínicos para demostrar tal beneficio. Hay que señalar que la abrumadora mayoría de los productos nutraceuticos se encuentran en la categoría "potencial", a la espera de establecerse (De Felice, 1995).

2.3 Nutraceuticos antioxidantes

Los antioxidantes son conocidos por estabilizar moléculas denominadas radicales libres, éstos conducen a un riesgo en la generación de estrés oxidativo y trastornos asociados. A niveles celular y molecular, inactivan especies reactivas de oxígeno y bajo concentración específica inhiben o retrasan los procesos oxidativos interrumpiendo reacciones en cadena del radical de la peroxidación de lípidos (Prakash & Gupta, 2009). Los fitoquímicos con capacidad antioxidante naturalmente

presentes en los alimentos, son productos orgánicos originados en el metabolismo secundario de plantas, de gran interés debido a sus efectos beneficiosos sobre la salud humana ya que ofrecen protección contra el deterioro oxidativo. Estudios epidemiológicos y en animales sugieren que el consumo regular de frutas, verduras y granos enteros, reduce el riesgo de enfermedades crónicas asociadas con daño oxidativo (Santini *et al.*, 2017).

Es ampliamente conocido que diferentes variedades de plantas, incluyendo hierbas, frutas, hojas y cortezas, y sus preparaciones caseras e industriales, se han utilizado en todo el mundo para disminuir el riesgo (prevención) y para tratar enfermedades y / o complicaciones de salud. Tales aplicaciones pueden provenir de uso tradicional o por evidencias científicas basadas en protocolos experimentales (Guarrera & Savo 2013).

Los polifenoles o compuestos fenólicos son los fitoquímicos de mayor importancia dentro del estudio de productos nutraceuticos, debido a los resultados benéficos que reportan (Granato *et al.*, 2017).

2.4 Nutraceutico: polifenoles

Los compuestos fenólicos o polifenoles, constituyen un grupo de sustancias químicas, las cuales se consideran metabolitos secundarios, y se encuentran distribuidos ampliamente en varios sectores del reino vegetal, especialmente en las familias Leguminosae, Rosaceae, Polygonaceae, Fagaceae, Rhyzophoraceae, Myrtaceae, y Melastomataceae (Ramaa *et al.*, 2006; Isaza, 2007).

En la actualidad este grupo de compuestos fitoquímicos presenta un gran interés por su contribución al mantenimiento de la salud humana. Así, muchas de las propiedades benéficas descritas en los alimentos de origen vegetal, asociadas principalmente a la actividad antioxidante de estos compuestos, están relacionadas con la presencia y con el contenido de compuestos fenólicos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Isaza. 2007).

Químicamente, los polifenoles poseen un anillo benceno, con uno o más grupos hidroxilos, incluyendo derivados funcionales como ésteres, glicósidos, etc. Se presentan en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos

a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos. Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos.

Los compuestos a los que se encuentran unidos con más frecuencia son: glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, y ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas y lípidos (Martínez *et al.*, 2002; García *et al.*, 2004).

Los polifenoles constituyen el grupo más numeroso con más de 40.000 metabolitos secundarios en plantas a las cuales proporcionan mecanismos de defensa química contra patógenos y estrés ambiental, así como el establecimiento de muchas interacciones planta-ecológicas (Amararathna *et al.*, 2016).

Los polifenoles funcionan como antioxidantes porque son excelentes donadores de hidrógeno que son aceptados por el radical reactivo para producir especies no radicales y especies radicales menos reactivas (Roleira *et al.*, 2015).

Una cuidadosa elección de las características físico-químicas de los polifenoles es crucial, ya que afecta fuertemente su biodisponibilidad y la reactividad química contra ROS (Chavarria *et al.*, 2015). La biodisponibilidad de polifenoles varía ampliamente de un compuesto a otro y los polifenoles más abundantes en nuestra dieta no son necesariamente los que tienen el mejor perfil de biodisponibilidad. En general, las modificaciones de sus estructuras químicas pueden mejorar su absorción, biodisponibilidad y capacidad para cruzar membranas celulares (Manach *et al.*, 2004).

Entre los candidatos nutraceuticos más interesantes para actuar como antiinflamatorios, los polifenoles son otro ejemplo destacado. Los beneficios del uso de polifenoles se asocian principalmente con su alta capacidad antioxidante que aminora el estrés oxidativo, pues actúan predominantemente como antioxidantes, eliminando los radicales libres y los iones metálicos quelantes. Algunos polifenoles también aumentan los niveles de glutatión y la expresión de enzimas antioxidantes

como glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa, además dadas sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, los polifenoles pueden inhibir la biosíntesis de AGEs a través de sus propiedades antioxidantes, capacidad de quelación de metales, interacción de proteínas, atrapamiento de metilglioxal y/o bloqueo del receptor para productos finales de glicación avanzada (AGEs). Todos son capaces de reducir el estrés oxidativo, que se ha asociado con enfermedades crónicas; y se cree que promueven la proliferación celular, además de causar entre otros, enfermedades del corazón, diabetes y enfermedades autoinmunes (Yeh *et al.*, 2017; Yahia, 2010).

Los compuestos fenólicos (polifenoles) se pueden dividir en varios subgrupos según sus características estructurales, sin embargo, los que se encuentran comúnmente en los alimentos vegetales pueden clasificarse en tres subgrupos principales: ácidos fenólicos, flavonoides y no flavonoides (**Figura 1**).

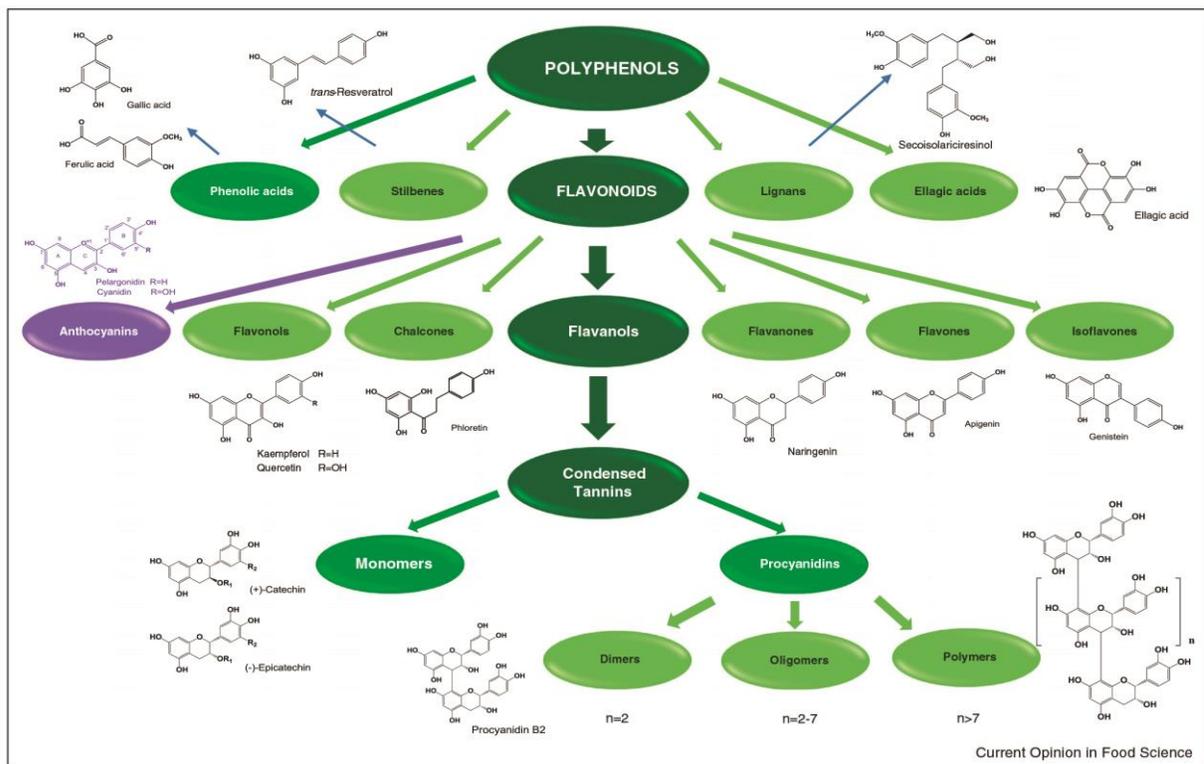


Figura 1. Clasificación de los polifenoles

(Tomado de Zhang & Tsao 2016).

2.4.1 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo diverso de compuestos polifenólicos conocidos principalmente como los pigmentos responsables de producir los colores presentes en flores, fruta, y hojas. Se han aislado e identificado más de 5000 flavonoides diferentes de fuentes vegetales. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, particularmente en células fotosintéticas de plantas (Havsteen, 2002).

Los flavonoides están compuestos por un esqueleto de 15 carbonos (C₆-C₃-C₆) y dos anillos de benceno unidos por una cadena lineal de 3 carbonos (**Figura 2**).

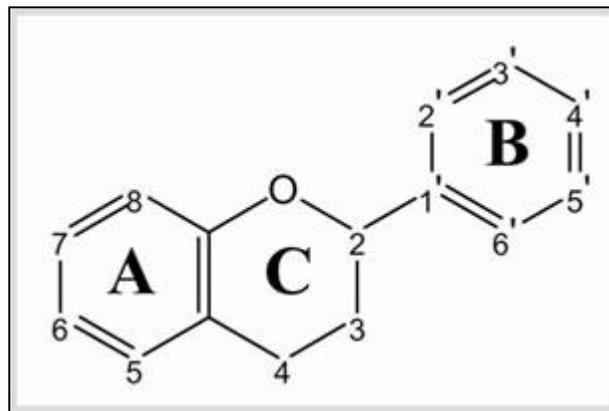


Figura 2. Estructura básica de un flavonoide.

Los flavonoides se pueden dividir en múltiples subgrupos de acuerdo con los patrones de sustitución del anillo C; y dentro de la misma clase pueden diferenciarse mediante la sustitución del anillo A y B (Kumar & Pandey, 2013; Middleton *et al.*, 2000). Existen seis subgrupos principales de flavonoides, incluyendo flavonoles (quercetina, kaempferol, miricetina), flavanonas (eriodictil, hesperetina, naringenina), isoflavonoides (daidzeína, genisteína, glicitiina), flavonas (apigenina, luteolina), flavans-3-ol (catequinas) y antocianinas (cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina).

Estos compuestos polifenólicos son conocidos por sus propiedades medicinales y actividades farmacológicas, por ejemplo, como agentes antioxidantes, antitumorales, antibacterianos y anti-inflamatorios. Tales actividades de los flavonoides dependen de su conformación estructural (Hossain, *et al.*, 2016; Prasain *et al.*, 2010).

La quercetina y la catequina son los flavonoides que presentan una mayor actividad antioxidante, debido a sus propiedades estructurales. La quercetina presenta un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en la posición 3 del anillo C, mientras que la catequina posee un grupo -OH en la posición 3 del anillo C. Dicha estructura hace que ejerzan una acción inhibitoria contra los radicales hidroxilo y superóxido, que son los principales inductores de la peroxidación de lípidos (Formica & Regelson, 1995). Además, estos compuestos son capaces de inhibir infecciones bacterianas, virales o fúngicas el desarrollo de tumores y son capaces de interactuar con un amplio número de proteínas, tales como enzimas, proteínas de tejido y receptores de membrana, modulando de manera específica su actividad.

Los flavonoides también son conocidos por modificar la actividad de enzimas como proteína quinasa C, proteína tirosina quinasa, aldosa reductasa, mieloperoxidasa, NADPH oxidasa, xantina oxidasa, fosfolipasa, la transcriptasa reversa, ornitina descarboxilasa, lipoxigenasa y cyclooxygenasa. Algunas de estas enzimas participan en las funciones inmunológicas, de carcinogénesis, transformaciones celulares, crecimiento tumoral y metástasis (George *et al.*, 2017).

Nuevos estudios han descrito el papel prometedor de los flavonoides en el tratamiento de la obesidad y la diabetes, así como sus enfermedades metabólicas asociadas. El potencial anti-diabético anti-obesidad asociado con los flavonoides es muy grande dado sus efectos reguladores sobre los transportadores de azúcar en la sangre mediante el aumento de la secreción de insulina, la reducción de la apoptosis, la promoción de la proliferación de células β pancreáticas y la reducción de la resistencia a la insulina, la inflamación y el estrés oxidativo en el músculo (Hossain *et al.*, 2016; Hajjaghaalipour *et al.*, 2015).

2.5 Nutraceuticos y estrés oxidativo

En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre la generación y degradación de radicales libres. Cuando este equilibrio se rompe, por producción de radicales en exceso, o por disminución de los sistemas de defensa, se origina lo que se conoce como daño o estrés oxidativo. Este daño se debe a la capacidad que tienen los radicales libres de actuar sobre las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos de la célula. Cuando los radicales libres interactúan con estos componentes celulares, se originan alteraciones estructurales y funcionales. Como consecuencia de ello, se produce un deterioro de la homeostasis de la célula y la aparición de diferentes enfermedades crónicas, e incluso la muerte celular (Espinosa-Diez *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2015). La inflamación y estrés oxidativo son mediadores en el desarrollo y progresión de la enfermedades crónicas y sus complicaciones, y se asocian al aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y disminución de la capacidad antioxidante (Ruiz *et al.*, 2013).

Cuando las células están expuestas al estrés oxidativo sufren fácilmente daño que conduce a una cascada de procesos degenerativos. El desarrollo de patologías severas incluyendo enfermedades neurodegenerativas, diabetes, cáncer, enfermedades hepáticas, enfermedades cardiovasculares y envejecimiento rápido están entre los posibles resultados. Se supone generalmente que el tratamiento terapéutico con antioxidantes es la forma más eficaz de controlar el estrés oxidativo y evitar la aparición de daño oxidativo (Georgiev *et al.*, 2014; Panieri *et al.*, 2013; Sugamura *et al.*, 2011). Se ha demostrado que el consumo o la suplementación nutraceuticos fitoquímicos como polifenoles, son capaces de restaurar la homeostasis redox y prevenir la inflamación sistémica o localizada mejorando las actividades de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx y GR. Las expresiones de estas enzimas desintoxicantes y antioxidantes son moduladas por un factor clave de transcripción el factor nuclear eritroide relacionado con factor (Nrf) -2 que puede ser activado por ROS a nivel celular. Nrf2 se transloca en el núcleo y regula la transcripción mediada por los elementos que responden a los antioxidantes de diversos genes que codifican las

enzimas antioxidantes mencionadas anteriormente (Köhle & Bock, 2006; Na & Surh 2008).

Además, los nutraceuticos polifenoles tambien pueden suprimir el estrés oxidativo mediante la reducción de las respuestas inflamatorias a través de la interferencia con el factor nuclear kappa B (NFkB) y mitógeno activado proteína quinasa (MAPK) controlada en las cascadas de señalización inflamatoria (Chuang & McIntosh, 2011).

Se ha demostrado que los polifenoles de la uva disminuyen la inflamación crónica ya sea por modulación de las vías inflamatorias o por la reducción de los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Como compuestos naturales, los flavonoides de la uva y las proantocianidinas pueden dirigirse a múltiples vías para superar la inflamación crónica; y son más eficaces en comparación con los fármacos anti-inflamatorios mono-dirigidos sintéticos (Sung *et al.*, 2012). El extracto liofilizado de uva que contiene principalmente flavonoides, antocianinas, proantocianidinas y derivados de ácido hidroxicinámico, ha mostrado una mayor actividad anti-inflamatoria en comparación con los antiinflamatorios no esteroideos comerciales indometacina. También se demostró que las proantocianidinas tienen una alta acción anti-inflamatoria, porque eliminan los radicales libres, previenen la peroxidación lipídica e inhiben la formación de citoquinas pro-inflamatorias (Panico *et al.*, 2006). Sin embargo, las bajas concentraciones de polifenoles naturales y su rápido metabolismo, una vez ingeridos, hacen que para el estudio de nutraceuticos requiera su administración en forma de píldoras, cápsulas, etc., en donde las moléculas se pueden concentrar y utilizar en una forma farmacéutica adecuada y en una forma eficaz en dosis (Bernal *et al.*, 2011).

En la actualidad, un número creciente de investigadores se centran en las actividades biológicas de posibles fuentes de nutraceuticos valiosos mediante sus componentes fitoquímicos; sin embargo, para lograr efectos terapéuticos beneficiosos, la mayoría de estos fitoquímicos se deben utilizar de una manera estrictamente dosis-dependiente. La biodisponibilidad en condiciones *in vivo* es una cuestión clave a resolver para establecer el nivel de concentraciones sanguíneas terapéuticas de flavonoides principalmente, para su empleo como nutraceuticos (Georgiev *et al.*, 2014).

2.5.1 Nutracéuticos y la diabetes mellitus

La diabetes mellitus se define como una enfermedad metabólica crónico-degenerativa, caracterizada por la elevación de los niveles de glucosa en sangre, defectos en la secreción o acción de la insulina; y por alteraciones en el metabolismo de lípidos y proteínas (American Diabetes Association, 2014). De esta enfermedad se conocen dos vertientes: diabetes tipo 1 o insulino dependiente y diabetes tipo 2 no insulino dependiente.

a) Diabetes tipo 1.

Se desarrolla por la destrucción autoinmune de las células β del páncreas, ocasionando una progresiva deficiencia en la producción de insulina. La sintomatología (poliuria, polifagia, polidipsia, pérdida de peso y cetoacidosis) se presenta cuando la tasa de destrucción de células, llega a un nivel crítico, causando insulinopenia e hiperglucemia (Ozougwu *et al.*, 2013).

b) Diabetes tipo 2

En la diabetes mellitus tipo 2 el tejido adiposo y el músculo esquelético son incapaces de responder a la acción de la insulina, lo que conlleva a una disminución en la captación de glucosa. La resistencia a la insulina en el hígado ocasiona que la síntesis de glucógeno sea inferior que en sujetos sanos, provocando un estado hiperglucémico en ayunas, por el incremento de la síntesis hepática de la glucosa (Kaur *et al.*, 2016; Kohei, 2010).

El estrés oxidativo aumenta el desarrollo de las complicaciones diabéticas debido al daño tisular que producen los radicales libres. De esta manera, se correlaciona el estrés oxidativo con el desarrollo de patologías como la nefropatía diabética y complicaciones cardiovasculares lo cual se complica aún más con los niveles elevados de glucosa en sangre (Ibarra *et al.*, 2006).

Los mecanismos que se proponen como contribuyentes para generar estrés oxidativo son:

- Ruta de los polioles y actividad de la aldosa reductasa.
- Incremento en el flujo de metabolitos a través de la vía de la hexosamina.
- Activación de la proteína kinasa c.
- Generación de productos de glicosilación avanzada (AGEs)

(Letelier *et al.*, 2017)

El estrés oxidativo ha sido relacionado con importantes acciones de daño como: peroxidación lipídica, oxidación de proteínas, daño de ácidos nucleicos, inducción de factores de transcripción NF-KB e inducción de apoptosis celular (Johar & Bernstein 2017; Fatani *et al.*, 2016).

A pesar de la disponibilidad de muchos medicamentos antidiabéticos en el mercado, esta patología y sus complicaciones se consideran entre los principales desafíos médicos, debido a los efectos adversos tanto a corto como a largo plazo del uso de fármacos hipoglucémicos (Vasconcelos *et al.*, 2011).

Como un enfoque proactivo alternativo, muchos fito-compuestos obtenidos a partir de plantas o de origen microbiano, pueden ser adoptados como agentes terapéuticos y / o preventivos. Los mecanismos de acción de muchos productos naturales como antidiabéticos pueden estar relacionados con la inhibición de enzimas glucolíticas como son la α -glucosidasa y α -amilasa, con efecto sobre la captación de glucosa y los transportadores de glucosa, lo que implica la modificación de sus mecanismos a través de receptores activados por el proliferador de peroxisoma, la inhibición de la actividad de la proteína tirosina fosfatasa 1B y las hormonas (insulina y glucagón) implicadas en la homeostasis de la glucosa **Cuadro 1** (Bahadoran *et al.*, 2013).

Cuadro 1. Fármacos convencionales y nutraceuticos en el tratamiento de diabetes

Clase de droga antidiabética	Mecanismo de acción	Fármaco convencional	Nutraceutico (Constituyente)	Forma herbal del nutraceutico
Insulino sensibilizador	AMPK/GLUT4	Metformina	Resveratrol	Frutas y plantas
			Miricetina	<i>Abelmoschus moschatus</i>
Insulino secretagogo	Modulación de la función de células β pancreáticas/ Diferenciación	Sulfonilureas/no sulfonilureas	Antocianinas	<i>Vaccinium sp</i>
			EGCG	<i>Litchi chinensis</i> <i>Camelia sinensis</i>
SGLT2 inhibidores	Modulación renal Reabsorción de glucosa	Gliflozin	Phlorizin	<i>Malus domestica</i>
α -glucosidasa inhibidores	Modulación de la glucosa. Absorción vía tracto intestinal	Acarbosa	Catequinas Flavanoles Flavonas Pycnogenol Quercetina	<i>Camellia sinensis</i> <i>P.pinaster</i> Cebolla, extractos de corteza de pino

(Alam *et al.*, 2016; Sung *et al.*, 2012)

Las hojas de *Morus alba L.* se han utilizado para el tratamiento de la diabetes. Su efecto en la diabetes tipo 2 se ha asociado a la posibilidad de que el extracto tenga una alta inhibición de las enzimas del citocromo P450. Esto sugeriría su empleo como un nutracéutico debido a su efecto por el contenido de compuestos bioactivos y baja interacción con otros fármacos en el manejo de la diabetes (Kar *et al.*, 2015).

El té verde es rico en polifenoles, posee el equivalente al 35% de su peso seco, siendo las catequinas (flavan-3-ols), y particularmente epigallocatequina-3-galato (EGCG), las que constituyen la mayor fracción de polifenoles del té verde. Éstas pueden provocar una serie de cambios que están asociados con efectos beneficiosos sobre la diabetes, incluyendo mejoras en la secreción de insulina, absorción de la glucosa, resistencia a la insulina, tolerancia a la glucosa, estrés oxidativo, inflamación y función mitocondrial. EGCG parece actuar a través de múltiples vías de señalización para ejercer estos efectos beneficiosos en la diabetes (Ferreira *et al.*, 2016; Kim & Kim, 2013).

Entre los candidatos nutracéuticos más estudiados como fuentes potenciales como antidiabéticos se encuentran: amorfrutinas, *Morus alba*, ácidos grasos y florizina. Los extractos nutracéuticos de las matrices vegetales representan una herramienta para prevenir, coadyuvar y tratar la diabetes y sus complicaciones por hiperglucemia como una alternativa a los tratamientos convencionales (Dragan *et al.*, 2015; Kar *et al.*, 2015; Ros *et al.*, 2015; Weidner *et al.*, 2012).

2.5.2 Nutracéuticos en hipercolesterolemia

La dislipidemia más frecuente e importante por su trascendencia etiopatogénica en las enfermedades cardiovasculares, es la hipercolesterolemia que se define como la presencia de niveles elevados de colesterol en sangre. La hipercolesterolemia provoca un mal funcionamiento del hígado a través de la esteatosis micro vesicular debido a la acumulación intracelular de lípidos (Maldonado- Saavedra *et al.*, 2012).

Para explorar el posible mecanismo de los fármacos hipolipemiantes, se ha empleado el tiloxapol, que es un surfactante no iónico utilizado ampliamente porque provoca un

aumento drástico en los niveles séricos de triglicéridos y colesterol debido al aumento de la síntesis de colesterol hepático, particularmente por el aumento de HMG Co- 3-metil-glutaril Co-A y por la inhibición de la lipoproteína lipasa responsable de la hidrólisis de los lípidos en plasma (Adeneye & Crooks, 2015). La inhibición significativa del aumento de los niveles de lípidos mediante extractos en este modelo es indicativa de la inhibición de la biosíntesis del colesterol por inhibición de HMG Co-A (Rajasekaran *et al.*, 2013). Esta enzima juega un papel clave en el control de los niveles de lípidos en el plasma y otros tejidos. La mayoría de los fármacos hipolipemiantes más recientes, como las estatinas, actúan a través de la inhibición de HMG Co-A (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa) (Adeneye *et al.*, 2010).

Los nutraceuticos desempeñan un papel peculiar en el mejoramiento de la dislipidemia humana, aunque el mecanismo exacto todavía es desconocido; y se infiere que los ingredientes funcionales pueden actuar sobre varias vías bioquímicas capaces de influir en los trastornos lipídicos en el cuerpo humano (Marazzi *et al.*, 2011).

Los polifenoles contenidos en la hoja de morera parecen reducir eficazmente el almacenamiento de ácidos grasos en el hígado y pueden contrarrestar la actividad de las enzimas implicadas en la creación de lípidos, tales como la sintetasa de ácidos grasos, la acetil-CoA carboxilasa o la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa. Las teaflavinas, los principales polifenoles del té negro, han demostrado tener efectos hipolipemiantes (Jin *et al.*, 2013). Estos nutraceuticos mejoran la hipercolesterolemia; aunque los mecanismos de acción de tales compuestos no son totalmente conocidos, parecen ser capaces de actuar selectivamente sobre la formación de colesterol LDL y, en cierta medida, sobre las concentraciones de triacilgliceroles en la sangre, mientras que no se ha observado reacciones adversas con HDL-C (Maki *et al.*, 2012).

Los polifenoles (20 g / día) y los fitoesteroles (6 g / día) han demostrado efectos comparativos de reducción de lípidos como la lovastatina en cerdos hipercolesterolémicos (Metzger *et al.*, 2009). De igual manera, la berberina es un nuevo compuesto natural capaz de reducir los lípidos plasmáticos. Este alcaloide derivado de Huanglian (*Coptis chinensis*), cuya estructura química es una benciltetrahidroxiquinolina, ha reducido el colesterol sérico aumentando la expresión

del mRNA del receptor de LDL independiente del colesterol circulante (Kong *et al.*, 2004). Este hallazgo es realmente importante debido al descubrimiento de una sustancia que actúa con un mecanismo diferente que las estatinas. Así, estatinas y berberina podrían combinarse para lograr un mejor control de los niveles de colesterol LDL en pacientes dislipidémicos (Kong *et al.*, 2008). Entonces se cree que los nutraceuticos podrían agregarse a los tratamientos farmacológicos comunes para la dislipidemia, como la terapia con estatinas, para mejorar e influir positivamente en el perfil lipídico. Además, pueden ser considerados como una herramienta útil cuando la terapia estándar, no puede ser adoptada debido a la intolerancia.

2.6 Ensayos toxicológicos de nutraceuticos

Los nutraceuticos son utilizados cada vez más como suplementos nutricionales en el tratamiento de enfermedades. Debido a su origen (generalmente plantas) éstos se consideran seguros para el consumo humano; sin embargo, los niveles de la sustancia activa consumida varían cuando se toma como un alimento entero, en comparación a su forma concentrada como nutraceutico (Penumetcha & Santanam, 2012).

El objetivo de los estudios de toxicidad general es el establecimiento del perfil toxicológico de la sustancia a analizar, determinar la relación entre la dosis administrada y la respuesta observada y determinación signos y dosis tóxicas. Se utilizan sistemas experimentales *in vitro* o *in vivo*, y los estudios se clasifican en cuanto a su duración en estudios de toxicidad de dosis única o en estudios de toxicidad de dosis repetidas (Ouedraogo *et al.*, 2012). En los estudios de toxicidad de dosis única o en estudios de toxicidad aguda, las dosis estudiadas son mucho mayores que la dosis efectiva estimada para el producto; por lo tanto, son útiles para la predicción de las consecuencias derivadas de las situaciones de sobredosis humana y permiten la determinación de las dosis de interés toxicológico, como la dosis letal 50 (DL₅₀) o la dosis máxima tolerada (Gil *et al.*, 2015).

Dentro de los ensayos *in vitro* se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad, capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la

supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular. Dentro de los ensayos más conocidos y ya validados se encuentran el ensayo de captación del rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid y por último el ensayo de reducción del Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) (Arencibia *et al.*, 2003).

La evaluación de seguridad no clínica para la aprobación de comercialización de un nutraceutico generalmente requiere de estudios farmacológicos, farmacocinética y los estudios de toxicidad (Shaw *et al.*, 2012). Dentro de los estudios de toxicidad específicos tales como estudios de genotoxicidad, toxicidad para la reproducción; y para los medicamentos o sustancias de uso crónico, una evaluación de potencial carcinogénico es indispensable; y se incluye por ejemplo el ensayo de micronúcleos, o ensayo cometa. Otros estudios no clínicos tales como la evaluación de fototoxicidad, inmunotoxicidad, alergenicidad o disrupción endocrina deben realizarse después analizando cada caso (Gil *et al.*, 2015).

La evaluación de la inocuidad de los nutraceuticos es necesaria, por lo tanto, se debe incluir un perfil de seguridad dentro de los estudios de productos potenciales como nutraceuticos.

2.7 Especies vegetales con potencial nutraceutico

Los extractos de corteza de especies del género *Pinus* como *Pinus pinaster*, *Pinus radiata*, *Pinus massoniana* han sido reportadas por su gran potencial para la identificación y desarrollo de nutraceuticos, debido a la presencia de propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, cardiovasculares, neuroprotectoras y anti- cáncer. Aunque sus estudios toxicológicos son limitados, no se ha reportado efectos adversos graves, por tanto se han publicado como fármacos nutraceuticos potenciales, así como también inocuos para su incorporación a alimentos (Li *et al.*, 2015). Bajo este contexto, se infiere que los extractos de corteza de especies como *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, pueden ser especies con potencialidad para actuar como nutraceuticos,

pues se ha reportado su actuación en la medicina tradicional en el tratamiento de trastornos como úlceras y problemas inflamatorios (Luna *et al.*, 2003; Bermejo & pontón 1999). Estudios previos han reportado efectos antibacterianos, y alto contenido fenólico antioxidante de extractos de *P. durangensis* (Rosales-Castro *et al.*, 2006; Rosales-Castro *et al.*, 2003), mientras que las investigaciones sobre extractos de *Q. sideroxylla* han demostrado su efecto hipoglucemiante, genotóxico, reductor del estrés oxidativo (evaluado en el modelo murino) (Soto-garcía *et al.*, 2016), y su alta capacidad antioxidante. Asimismo, se ha demostrado efecto antiinflamatorio y anticancerígeno en colon de rata (Moreno-Jiménez *et al.*, 2015). La presencia de flavan-3-ols en *Q. sideroxylla* (Rosales *et al.*, 2012); y flavonoides como taxifolina y quercetina en *P. durangensis* (Rosales-Castro *et al.*, 2017; Soto-García & Rosales-Castro, 2016), le confieren su potencial nutraceutico.

2.7.1 Descripción de *Pinus durangensis* Martínez

Los pinos (*Pinus*) pertenecen a la familia de las pináceas del género *Pinus*, son de amplia distribución con aproximadamente 49 especies, 18 variedades, 2 subespecies en las cadenas montañosas de todo el país (García-Ortega *et al.*, 2002). Algunas de sus características son: árbol de fuste recto de hasta 40 m de altura y 15 dm de DAP; copa redondeada y compacta en los árboles maduros, con ramas péndulas a horizontales, frecuentemente sigmoideas; árboles jóvenes con copa de forma cónica, posee ramillas tiernas a veces con tinte azulado, su corteza es rugosa y dividida en grandes placas escamosas de color café oscuro, café pálido en la parte media, y separadas por fisuras.

Sus conos son ligeramente curvados, ovoides, de 6 a 10 cm de largo, de color café rojizo, generalmente en grupos de 2 a 3, a veces solitarios. Escamas del cono tiesas, duras, con ápice redondeado o subagudo; apófisis levantada, subpirimidal, transversalmente aquillada; umbo dorsal, levantado, reflejo, gris ceniciento, con una espina aguda, corta, a veces recurvada, decidua o persistente. Semillas pequeñas, de color gris, subtriangulares, de 5 a 7 mm de largo, con ala de color amarillento. (**Figura 3**).

Nombres comunes: ocote, pino alazán, pino blanco, pino real, pino real de seis hojas (García-Arévalo & González-Elizondo, 1998).



Figura 3. *Pinus durangensis* Martínez

2.7.2 Descripción de *Quercus sideroxyla* Humb. & Bonpl.

Árbol de 5 a 8 m de altura y con un diámetro del tronco de 20 a 65 cm, cuya corteza es café oscura; y con hojas oblanceoladas de 4.5 a 11 cm de largo por 1.5 a 4.5 cm de ancho; margen con 1 a 6 aristas a cada lado; haz verde amarillento ligeramente lustroso; envés blanco-amarillento y tomentoso. Su fruto puede ser bianual, solitario o en pares con bellotas ovoides de 10 a 15 mm de largo por 7 a 10 mm de diámetro (Figura 4).

Los principales usos de esta especie son como leña, carbón y extracción de celulosa para papel. Hábitat: laderas, en bosques de pino-encino y bosque tropical subcaducifolio entre 1,900 a 2,200 msnm y sobre suelos pedregosos y someros.

Nombre común: encino colorado (Arizaga, 2009).



Figura 4. *Quercus sideroxyla* Humb. & Bonpl.

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes mellitus, cáncer y patologías cardiovasculares, son un problema de salud pública que representa un gran desafío para la sociedad y los sistemas de salud, debido a la pérdida de calidad de vida para quienes padecen la enfermedad, así como por los recursos que se requieren para su atención. Por tal motivo el implemento de estrategias de prevención y/o coadyuvantes en el tratamiento pueden ser altamente costo efectivas al reducir la incidencia de dichas enfermedades.

Los compuestos bioactivos, (polifenoles) de las plantas son una importante fuente de nutraceuticos, y éstos constituyen un medio para la prevención y tratamiento de enfermedades debido a los efectos benéficos a la salud que proporcionan.

Las especies forestales maderables *P. durangensis* (pino) y *Q. sideroxylla* (encino) son importantes por su calidad maderable, distribución y abundancia en el estado de Durango. La corteza de ambas especies no tiene valor comercial y representan un alto volumen de desperdicio. Por su alta concentración de polifenoles se propuso un posible uso terapéutico, sin embargo hacía falta investigación en el área biológica sobre sus propiedades farmacológicas, el efecto toxicológico, así como verificar la reproducibilidad de sus compuestos químicos principales para proponer su uso como nutraceuticos que representen alternativas naturales de estrategia preventiva y/o tratamiento de enfermedades crónico degenerativas.

4. HIPÓTESIS

Los extractos polifenólicos de la corteza de las especies *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, ejercen un efecto nutraceutico sobre hiperglucemia e hipercolesterolemia desarrollado en un modelo murino, sin causar efectos toxicológicos, que permita sugerir su uso nutraceutico

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto nutracéutico de extractos polifenólicos de cortezas de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, aplicada en un modelo de hiperglucemia e hipercolesterolemia en murino y el efecto toxicológico de los mismos.

5.2 Objetivos específicos

1. Obtener extractos crudos y orgánicos de las cortezas de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*; y evaluar la concentración de polifenoles.
2. Identificar los principales polifenoles en los extractos para verificar la reproducibilidad de éstos en las especies.
3. Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos con métodos *in vitro* y mediante el método de lipoperoxidación hepática *in vivo* en modelo murino de diabetes e hipercolesterolemia
4. Evaluar el efecto hipoglucémico e hipocolesterolémico de los extractos en un modelo murino; y la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa *in vitro*.
5. Evaluar el efecto toxicológico, citotóxico y genotóxico de los extractos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

Corteza de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*.

6.1.1 Colecta de corteza de las especies de estudio

El muestreo se realizó en enero de 2014, en el predio Peñitas del ejido San Pablo, del Salto Pueblo Nuevo Durango. Se recolectó la corteza de cuatro a seis árboles por especie y a diferentes alturas del árbol.

Los ejemplares botánicos de las especies fueron identificadas por la Dra. María del Socorro González Elizondo, especialista de estos géneros; y se se depositaron en el Herbario del CIIDIR-IPN Unidad Durango.

La corteza se dejó secar a temperatura ambiente bajo la sombra, posteriormente se molió mediante un molino Willey hasta un tamaño de partícula de malla de 40 y luego se mezcló a fin de tener una sola muestra por especie. La corteza se depositó en bolsas herméticas y se guardaron hasta su utilización.

6.2 Métodos

Cada etapa experimental, corresponde a un objetivo específico, por lo que se abordarán en ese orden:

6.2.1 Obtención de extractos crudos y orgánicos de las cortezas de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*; y la evaluación de la concentración de polifenoles

Esta etapa experimental se divide en dos partes, las cuales se representan en el siguiente diagrama (**Figura 5**).

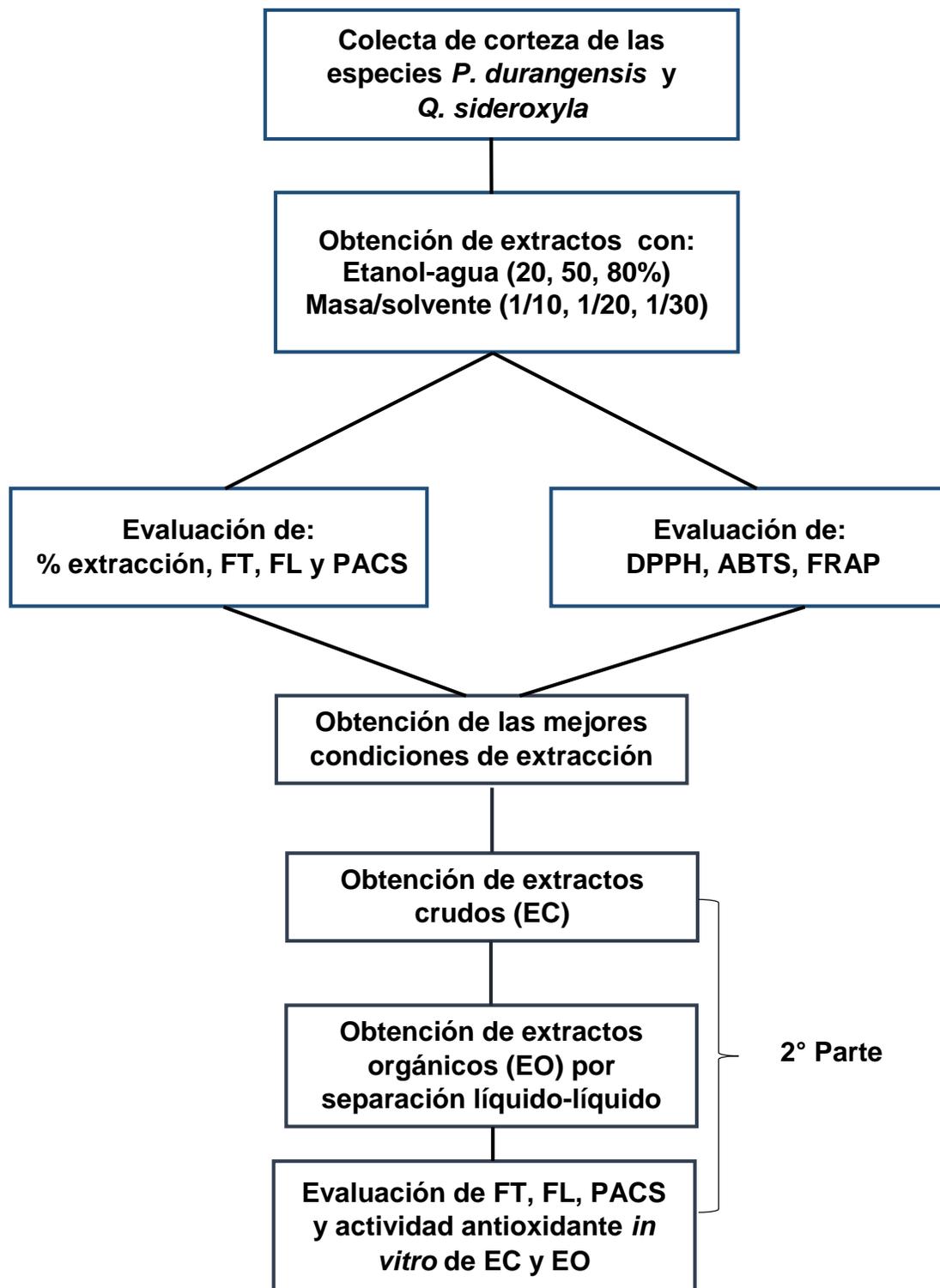


Figura 5. Diagrama de flujo de la primera etapa experimental: obtención y caracterización de extractos polifenólicos

6.2.1.1 Obtención de extractos para definir las mejores condiciones de extracción

Para evaluar el efecto del solvente y de la relación masa de corteza: solvente (M: S) como parámetros de extracción, se obtuvieron extractos a partir de corteza seca y triturada. Se empleó como solvente de extracción soluciones etanol-agua al 20, 50 y 80%; así como las relaciones M: S 1/10, 1/20 y 1/30. La preparación consistió en macerar la corteza en el solvente a temperatura ambiente durante 24 h, para posteriormente filtrar con papel filtro. A la corteza remanente se le adicionó nuevamente solvente fresco y se repitió el proceso. Los extractos obtenidos de la primera y segunda maceración se combinaron y concentraron en rota vapor a 35 °C aplicando vacío, obteniendo un extracto acuoso concentrado, el cual se llevó a sequedad en la campana de extracción a fin de obtener un extracto pulverizado.

Los extractos obtenidos se sometieron a la evaluación polifenólica y a la evaluación antioxidante (cuya descripción se detalla más adelante).

Una vez obtenidas las condiciones de extracción se obtuvieron los extractos crudos y orgánicos de las cortezas de las especies *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, con los que se desarrollaron todas las evaluaciones posteriores.

6.2.1.2 Extractos crudos (EC)

Se pesaron 10 g de corteza para ambas especies de estudio. La maceración se realizó con etanol al 50%, (300 y 100 mL para *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* respectivamente). El proceso de maceración, filtración, concentración y secado de los extractos se realizó como se describió previamente en el análisis de parámetros de extracción en la obtención de extractos preliminares.

6.2.1.3 Extractos orgánicos (EO)

De la fracción concentrada de la obtención de EC, se realizó una purificación primaria mediante una extracción liquido-liquido con acetato de etilo (3 x 100 mL) en un embudo de separación, en el cual la mezcla fue agitada vigorosamente, para después dejar en reposo y permitir la separación de las fases inmiscibles. La fracción de compuestos

soluble en acetato de etilo (fase orgánica), se separó de la fase insoluble; y se evaporó a sequedad empleando vacío a 40°C.

6.2.1.4 Determinación de rendimientos y/o contenido de sólidos

Se evaluó la cantidad de sólidos totales disueltos con el solvente de extracción.

El resultado corresponde al porcentaje en peso del extracto seco con respecto a la cantidad de corteza base seca utilizada en la extracción. Para su expresión se empleó la siguiente ecuación:

Ec. 1

$$\text{Extracto total} = \frac{\text{Peso total de sólidos extraídos}}{\text{cantidad de muestra seca utilizada en cada extracto}}$$

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

6.2.1.5 Determinación del contenido fenólico (FT)

Se cuantificó el contenido fenólico de los extractos de corteza siguiendo la metodología de Folin-Ciocalteu, mediante el procedimiento descrito por Rosales-Castro *et al.*, (2012). Se tomaron 50 µL de extracto a concentración de 1000 ppm, se le adicionaron 3 mL de agua destilada y posteriormente se le añadieron 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (2N). Después de un minuto y antes de 8 de agregar el reactivo de Folin, se adicionaron 750 µL de carbonato de sodio (20%). Por último se añadió 950 µL de agua destilada. Se agitaron y dejaron en reposo por 2 horas. Se utilizó una curva de calibración con ácido gálico a concentraciones de 100 a 500 mg/L. Se tomó la absorbancia a 760 nm contra blanco sin muestra y los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico en mg/g de extracto seco (mg EAG/g e). Las determinaciones se realizaron en dos experimentos independientes por duplicado.

6.2.1.6 Determinación de flavonoides (FL)

Se utilizó el procedimiento descrito por Heimler *et al.* (2005). Para este ensayo cada uno de los extractos secos se diluyó con metanol a una concentración de 1000 ppm.

De cada uno de los extractos diluidos se tomó una alícuota de 250 μL y se le adicionaron 75 μL de nitrito de sodio 5%, 150 μL de cloruro de aluminio 10% (recién preparada) y 500 μL de hidróxido de sodio 1M. Se ajustó a un volumen final de 2.5 mL con agua destilada. Se dejó en reposo durante 5 min, para luego medir la absorbancia a 510 nm contra blanco sin muestra. Se construyó una curva de calibración con catequina a cinco concentraciones, (50, 100, 150, 200, 250) mg/L. Los resultados se expresaron como equivalentes de catequina en mg/g extracto seco (mg EC/g e). Las determinaciones se realizaron en dos experimentos independientes por duplicado.

6.2.1.7 Determinación de proantocianidinas (PACS)

Se siguió el procedimiento propuesto por Heimler *et al.*, (2005). A una muestra de 50 μl (a 1000 ppm) se le adicionaron 3 ml de una solución de vainillina en metanol al 4% y 1.5 ml de HCl concentrado. La muestra se dejó reposar durante 15 min y posteriormente se midió la absorbancia a 500 nm contra un blanco de metanol. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de catequina/g de extracto seco (mg EC/g e), utilizando una curva de calibración de catequina a concentraciones de 100 a 600 mg/L. Las determinaciones se realizaron en dos experimentos independientes por duplicado.

6.2.2 Identificación de los principales polifenoles en los extractos

6.2.2.1 ANÁLISIS POR HPLC- UV-DAD

Se analizaron los EC de ambas especies de investigación, los cuales fueron disueltos en metanol. Se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Hewlett-Packard 1100, con arreglo de diodos, columna C18 (Waters, 4x150 mm, 3 μm poro). El sistema de elución fue 0,1% de ácido fórmico en agua (fase A) y acetonitrilo (fase B), con flujo de 0,5 ml/min, con gradiente de 0-5 min, 15% B, 5-10 min, 20% B, 10-20 min, 35% B, 20-30 min, 50% B, 30-40 min, 60% B y 40-45 min, 15% B. Se inyectaron 50 μL de muestra, y los picos eluidos fueron monitoreados a 250, 280 y 370 nm. Los compuestos fenólicos fueron caracterizados de acuerdo a sus espectros de UV, en las diferentes longitudes de onda.

6.2.2.2 ANÁLISIS POR HPLC-ESI-MS

Los EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* se disolvieron en metanol HPLC; y los espectros se obtuvieron usando un espectrómetro de masas micrOTOF-QII (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI). Los parámetros se ajustaron de la siguiente manera: capilaridad 2700 V, presión del nebulizador 1,2 bar, flujo de gas 11 L / min y temperatura del gas 200 ° C. La muestra se llevó a cabo en el modo de ion negativo. El intervalo de exploración fue de 50 a 3000 m / z.

6.2.3 Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos con métodos *in vitro* y mediante el método de lipoperoxidación hepática *in vivo*

6.2.3.1 Evaluación de capacidad antioxidante mediante DPPH

Se siguió el procedimiento propuesto por Brand-Williams et al. (1995), con algunas modificaciones. Se preparó una solución del radical DPPH (2,2-difenilo-1-picrylhidracilo) a concentración de 2.4 mg/100 ml (6.09×10^{-5} M), disuelta en metanol. Los extractos se disolvieron en metanol a una concentración de 200 mg/L. Se adicionaron en un tubo de ensayo 50 µl de extracto y 1950 µl de la solución DPPH, se agitó, y se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) durante 30 min. Para el control se utilizó metanol en lugar de muestra. Se utilizó catequina y taxifolina como estándares de referencia. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 515 nm, tanto de la muestra (Am) como de un control (Ac).

Los resultados se expresaran como porcentaje de inhibición, los cuales se obtuvieron de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% ARL = \left[\frac{(Ac-Am)}{Ac} \right] \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

Las determinaciones se realizaron en dos experimentos independientes por duplicado.

6.2.3.2 Evaluación de capacidad antioxidante mediante ABTS

Se realizó según la metodología propuesta por Re *et al.*, (1999) con algunas modificaciones. El radical ABTS (Acido, 2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) se obtuvo mediante la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) 2.45 mM. Posteriormente se aforó con agua a un volumen de 10 ml e incubó a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ C$) con agitación y en la oscuridad durante 16 h. Formado el radical ABTS se colocó en viales de 1 ml y se guardó en congelación a $-7^\circ C$. Se diluyó 1ml del ABTS con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0.70 (± 0.1) a una longitud de onda de 754nm. Los extractos se disolvieron en etanol a una concentración de 200 mg/L. En un tubo de ensayo se depositaron 50 μ l de muestra y 1950 μ l de ABTS, se agitaron y mantuvieron en la oscuridad durante 10 min. Para el control (Ac) se utilizó etanol en lugar de muestra (Am). Se utilizó catequina y taxifolina como estándares de referencia. Posteriormente se leyó la absorbancia a 754 nm, tanto de la muestra, como del control.

Los resultados se expresaran como porcentaje de inhibición, los cuales se obtuvieron de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% ARL = \left[\frac{(Ac - Am)}{Ac} \right] \times 100 \quad Ec. 3$$

Las determinaciones se realizaron en dos experimentos independientes por duplicado.

6.2.3.3 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante FRAP

La evaluación de la capacidad antioxidante mediante FRAP (Poder Antioxidante Reductor del Hierro, en español) se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Rosales-Castro *et al.*, (2012).

El FRAP fue preparado con buffer acetato a 300mM (pH 3.6), TPTZ (2, 4,6- tri [2-pyridil]-s-triazine) 10mmol/L disuelto en HCl a 40 mM/L, y una solución de cloruro férrico ($FeCl_3$) a 20 mM/L, a una relación 10:1:1. Posteriormente se mezclaron 100 μ l de extracto (200 mg/L) con 3 mL de FRAP y se incubaron a 25 $^\circ C$ durante 10 min. Transcurrido el tiempo, la absorbancia se midió a 593 nm. El blanco consistió en 3mL

reactivo de FRAP y 100 μ l de diluyente empleado en la muestra (agua destilada). Se utilizó catequina y taxifolina como estándares de referencia. Se realizó una curva de calibración con ácido ascórbico 500 mM (50-300 mg/L). Los resultados se expresan como μ mol equivalentes de ácido ascórbico (μ M EAA). Las determinaciones se realizaron en dos experimentos independientes por duplicado.

6.2.3.4 Evaluación antioxidante mediante la prueba de lipoperoxidación hepática *in vivo*

Se realizó sólo a extractos que mostraron una mayor actividad biológica en los modelos murinos de hiperglucemia e hipercolesterolemia.

Los niveles de estrés oxidativo se evaluaron por la concentración de malondialdehído (MDA) en el hígado, mediante el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBAR's).

El nivel de peroxidación en hígado se midió según Rivera- Ramírez., *et al.*, (2011). Para la prueba se pesó una fracción del hígado (50 mg) y se homogeneizó con 0,5 mL de solución buffer de fosfatos (pH 7,0), luego se añadió 1 ml del reactivo de TBARS, el cual contiene ácido tricloroacético (TCA), ácido tiobarbitúrico (TBA), y HCl (15 % (w/v), 0,375% (w / v), y 0,25 N, respectivamente). Las muestras se colocaron en un baño de agua a temperatura de ebullición durante 30 min, después se dejó enfriar, para luego centrifugar a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se separó; y luego se leyó la absorbancia a 535 nm. Se utilizó un blanco sin muestra. La concentración de MDA se calculó utilizando el coeficiente de extinción de $1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados se expresaron en MDA mM / g de tejido.

6.2.4 Evaluación del efecto hipoglucemiante e hipocolesterolemiante en un modelo murino; y la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa *in vitro*

6.2.4.1 Inhibición de la enzima α -amilasa *in vitro*

La evaluación del efecto inhibitorio se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Kwon *et al.*, (2008), con ligeras modificaciones, lo cual se detalla a continuación: A 500 μ L de extracto se le adicionaron 500 μ L de la solución enzimática la cual se preparó a una concentración de 0.5 mg/mL, y fue disuelta en buffer de fosfato de sodio

0.02 M a pH 6.9 con 0.006M de NaCl, posteriormente se incubaron a 25°C durante 10 min. Después de la pre-incubación, se adicionaron 500 µL de una solución de almidón al 1% (disuelto en buffer fosfatos de sodio 0.02M); y nuevamente se incubaron a 25°C durante 10 min. Una vez concluido el tiempo, la reacción se detiene con 1 mL de reactivo indicador (contiene la mezcla de ácido dinitrosalicílico 96M (DNS) y tartrato de sodio-potasio 0.005M); y se llevaron a ebullición en baño maría durante 5 min. Por último se dejaron enfriar a temperatura ambiente para luego adicionar 10 mL de agua destilada. Se midió la absorbancia a 540 nm. La acarbosa fue empleada como control de referencia, también se preparó un control experimental (Ac) al cual se le adiciona 500 µL de buffer fosfatos de sodio, (en lugar de extracto (Am)), puesto que éste será el referente donde se lleva a cabo el 100% de la reacción.

La determinación del porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{(Ac-Am)}{Ac} \right] \times 100 \quad \text{Ec. 4}$$

Los resultados obtenidos permitieron el cálculo de la CE₅₀, mediante regresión lineal. Las determinaciones se realizaron en al menos dos experimentos independientes por duplicado.

6.2.4.2 Inhibición de la enzima α-glucosidasa *in vitro*

La determinación del porcentaje de inhibición de esta enzima fue realizada de acuerdo a la metodología de Vongsak *et al.*, (2015); a 50 µL de extracto se le adicionaron 10 µL de enzima a concentración de 0.9mg/mL (se disolvió en buffer fosfatos de sodio 0.01M pH 7.4), además de 400 µL de buffer fosfatos de sodio 0.01M. La mezcla se lleva a incubar a 37 ° C durante 10 min., posteriormente se añade 10 µL de p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (PNPG) 20 mM y 400 µL de carbonato de sodio (NaCO₃) 0.1M. Se volvieron a incubar a 37°C durante 75 min. La absorbancia se determinó a 405 nm. La acarbosa fue empleada como control de referencia. Se preparó un control experimental (Ac) al cual se le adiciona 50 µL de buffer fosfatos de sodio, (en lugar de extracto (Am)), puesto que éste será el referente donde se lleva a cabo el 100% de la reacción.

La determinación del porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{(Ac-Am)}{Ac} \right] \times 100 \quad \text{Ec. 5}$$

Los resultados obtenidos permitieron el cálculo de la CE₅₀, mediante regresión lineal. Las determinaciones se realizaron en al menos dos experimentos independientes por duplicado

6.2.4.3 Animales

Los animales de experimentación que se emplearon en este estudio fueron ratas Wistar macho, los cuales se obtuvieron del bioterio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional; y los ratones macho de ICR-CD1 se obtuvieron de PROPECUA S.A. México. Todos los experimentos se sujetaron a los lineamientos marcados por el Comité de Bioética de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN y fueron conducidos en conformidad con la NOM -062-200-1999 especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Los animales se alojaron en jaulas de policarbonato en ambiente controlado a temperatura de 21° ± 2 °C, con ciclos de 12 h luz/oscuridad; y acceso al alimento y agua *ad libitum*.

6.2.4.4 Evaluación de la actividad hipoglucemiante

De acuerdo a los resultados obtenidos de la determinación de FT, se eligieron las dosis a probar en la evaluación de actividad hipoglucemiante. Además del grupo control, se formaron lotes de 5 animales, con 3 dosis de EC y 2 dosis de EO los cuales se indican a continuación:

- *P. durangensis* EC 50 mg/Kg (PdEC50)
- *Q. sideroxylla* EC 50 mg/kg (QsEC50)

- *P.durangensis* EC 100 mg/kg (PdEC100)
- *P.durangensis* EC 200mg/Kg (PdEC200)
- *P.durangensis* EO 50 mg/kg (PdEO50)
- *P.durangensis* EO 100 mg/Kg (PdEO100)
- *Q. sideroxylla* EC 100 mg/kg (QsEC100)
- *Q. sideroxylla* EC 200 mg/kg (QsEC200)
- *Q. sideroxylla* EO 25 mg/kg (QsEO25)
- *Q. sideroxylla* EO 50 mg/kg (QsEO50)

La actividad hipoglucemiante se obtuvo realizando una curva de tolerancia a la glucosa en ratas macho Wistar con un peso promedio de 300 g. Los animales de estudio permanecieron en ayuno previo de 12 horas antes de la prueba.

La glucosa basal se determinó empleando tiras reactivas de glucosa en glucómetro (Accu-Chek Performa con Softclix, Roche), para ello se tomó una gota de sangre al hacer una pequeña incisión en la punta de la cola del animal. Posteriormente se realizó la administración vía oral del extracto al tiempo cero. Después de quince minutos a todos los animales se les indujo hiperglucemia por administración vía oral de glucosa al 35% (3g/kg peso corporal). Al grupo control sólo se le administró glucosa.

La concentración de glucosa en sangre se monitoreó a los tiempos 0, 30, 60, 90 y 120 minutos en cada grupo. De los resultados se obtuvieron las curvas de glucemia frente al tiempo, de donde se determinó el área bajo la curva (AUC) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{AUC (g/ L min)} = \{(G_{t_{x+1}} + G_{t_x}) * [(t_{x+1}) - t_x]\} / 2 \quad \text{Ec. 6}$$

Donde:

G_{t_x} = valor de glucosa en g/L al tiempo cero ($t_x = \text{min}$)

$G_{t_{x-1}}$ = valor de glucosa en g/L al tiempo t_{x+1} (min)

$[(t_{x+1}) - t_x] = (t_1 - t_0), (t_2 - t_0) \dots (t_n - t_0)$

El UAC permitió evaluar el efecto del extracto frente a la tolerancia a la glucosa.

6.2.4.5 Evaluación del efecto hipoglucemiante en un modelo murino con diabetes inducida

Se emplearon los extractos que manifestaron mayor actividad hipoglucemiante según los resultados obtenidos de la AUC. El efecto hipoglucemiante de extractos se evaluó en ratas macho Wistar (n=5 animales/dosis de extracto) con diabetes tipo I, previamente inducida con estreptozotocina (STZ), la cual se preparó en solución amortiguadora de citratos a pH 4.4; y administrada vía intraperitoneal a dosis de 65 mg/kg de peso corporal. Después de 24 horas, la diabetes en animales fue confirmada por la medición de los niveles de glucosa (mediante tiras reactivas de glucosa) en sangre obtenida del corte de la cola del animal. Después de 5 días, los animales recibieron el extracto durante 10 días, en los cuales se midieron los niveles de glucosa (1°, 3°, 6° y 10° día); y se estuvo comparando contra un grupo de animales control (control negativo) y un grupo de animales con diabetes inducida, (control diabético). Al término del periodo de la prueba los animales fueron sacrificados. Se tomaron muestras de hígado para los ensayos de lipoperoxidación hepática para determinar la actividad antioxidante *in vivo*.

6.2.4.6 Evaluación de la actividad hipocolesterolémica en un modelo murino

La actividad hipocolesterolémica de EC y EO se evaluó en ratones machos de la cepa NIH-CD1. Las dosis evaluadas fueron 50 mg/kg peso corporal y 100 mg/kg peso corporal de EC y EO de cada especie. Cada dosis de extracto conformó un grupo de animales (n=5). Animales sanos (n=5, sin tratamiento) fueron empleados como control negativo y otro grupo de animales hipercolesterolémicos como control positivo con el fin de realizar comparaciones y evaluar el efecto de los EC y EO.

La administración del EC y EO a los animales fue vía oral. Después de 30 minutos se indujo la hipercolesterolemia con tiloxapol (400mg/kg peso corporal vía intraperitoneal). Después de 22 horas se realizó una segunda administración de EC y EO. Dos horas después se realizó una punción retro orbital a fin de tomar la muestra de sangre de la cual se obtuvo el suero, mediante separación por centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos. Los niveles de colesterol total (TC), triglicéridos (TG) y colesterol HDL (HDL) se determinaron utilizando kits comerciales (RANDOX).

Concluida la evaluación se sacrificaron a los animales. Se obtuvieron las muestras de hígado para los ensayos de lipoperoxidación hepática.

6.2.5 Evaluación del efecto toxicológico, citotóxico y genotóxico de los extractos

La determinación de efectos tóxicos se llevó a cabo con las pruebas de dosis letal media, citotoxicidad y ensayo del cometa.

6.2.5.1 Evaluación de dosis letal media (DL₅₀)

Se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Lorke (1983).

Se formaron 2 grupos de ratones machos sanos de la cepa NHI-CD1 (n=3), los cuales contaban con ayuno previo de 12 h. A cada grupo se le administró vía oral una dosis de EC de la especie en cuestión. Inicialmente la dosis fue de 1000 mg/kg de peso corporal (se utilizó solución salina al 0.9% como vehículo).

La evaluación consistió en determinar el número de animales que presentaron muerte espontánea y subsecuente a las 24 h, así como la presencia de letargo, convulsión, diarrea y piloerección. De encontrar negativos todos los aspectos a evaluar, se procedió a la administración de una dosis más alta según la tabulación que marca la metodología. Las dosis subsecuentes administradas a nuevos grupos de ratones sanos fueron de 2000, 3000 y 5000 mg/kg de peso corporal.

Los efectos toxicológicos se expresaron en términos de mortalidad, definida como DL₅₀.

6.2.5.2 Evaluación citotóxica

Se utilizaron 4 líneas celulares a las cuales se les aplicó distintas dosis de EC y EO de las especies de estudio. La evaluación citotóxica se efectuó mediante la técnica colorimétrica MTT, con la que se determinó el efecto de los extractos sobre la viabilidad celular y la CE₅₀.

*** Líneas celulares y condiciones de cultivo celular**

Las líneas tumorales MDA-MB-231 (cáncer mamario), HeLa (cáncer cervicouterino) y las líneas no tumorales MCF-10A (células epiteliales mamarias) y HSF-1184

(fibroblastos de piel humana) fueron obtenidos de la ATCC, USA (American Tissue Culture Collection).

Las células HeLa, MDA-MB-231 y HSF-1184 fueron cultivadas con medio DMEM alto en glucosa, suplementado con suero fetal bovino al 10% (en el caso de las células de cáncer mamario fue al 5 %) y 1% de antibiótico (estreptomina/penicilina 1000 U/mL).

La línea celular MCF-10 A, se cultivó con medio DMEM/F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% y 1% de antibiótico.

Las células fueron incubadas a 37°C en cámara húmeda, en una atmósfera al 5% de CO₂.

* Ensayo de viabilidad

La viabilidad celular se midió mediante la sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio), de acuerdo a Prestegui-Martel *et al.*, (2016). Cada línea celular se colocó en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/pocillo; y se incubaron a 37°C, con aire humidificado y 5% de CO₂ durante 24 h para permitir su adherencia a la placa. Después el medio fue reemplazado con 200 µL del tratamiento de *P. durangensis* y de *Q. sideroxylla* a diferentes concentraciones (se obtuvieron a partir de las diluciones de una solución madre del extracto en cuestión; y luego se añadieron al medio de cultivo). Las células sin tratamiento se emplearon como control negativo, cuya viabilidad expresó el 100%.

Posteriormente las células se incubaron durante 72 horas en las condiciones antes mencionadas. Transcurrido el tiempo se añadieron 100 µL de MTT (5 mg / mL, disuelto en medio de cultivo) en cada pocillo; y se incubaron durante otras 2.5 h.

Se retiró el MTT y los cristales de formazán se disolvieron en 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). La absorbancia se midió a 550 nm. El ensayo se realizó por triplicado en dos ensayos independientes.

Para determinar la viabilidad, y la concentración que conduce al 50% de inhibición de la viabilidad (CE₅₀) se calculó mediante análisis de regresión utilizando la siguiente ecuación:

$$\% Viabilidad = \left[\frac{(Abs \text{ células tratadas})}{(Abs \text{ células control})} \right] \times 100 \quad \text{Ec. 7}$$

6.2.5.3 Evaluación genotóxica

El efecto genotóxico se evaluó de acuerdo a la metodología descrita por Almonte-Flores, *et al.*, (2015).

Se emplearon ratones macho de la cepa CDI con peso de 25-30 g, los cuales se distribuyeron en seis grupos experimentales (n=6), los EC de ambas especies de estudio fueron suspendidas en tween 80 al 1 % y se administraron vía oral. Las dosis evaluadas fueron 100 y 200 mg/kg peso corporal.

El control negativo se administró oralmente con el vehículo de los extractos y el control positivo recibió ciclofosfamida (CPA) a dosis de 50 mg/Kg peso corporal vía intraperitoneal, con la que se le indujo daño al ADN.

Transcurridas 4 y 24 h después de administrar los extractos de las especies en estudio a los grupos de animales, se les realizó una punción retro orbital para tomar una muestra de sangre heparinizada, de la cual se apartó una alícuota de 30 µL la cual se mezcló con 140 µL de agarosa con bajo punto de fusión (1.5%) a 37 °C; y se extendió rápidamente sobre un portaobjetos previamente recubierto con una capa de agarosa de fusión normal (1.5%). Después de solidificar se retiró el cubreobjetos y los portaobjetos se colocaron en solución de lisis fría (NaCl 2.5 M, 2.5 EDTA. Tris 10 mM, succinato de sodio, 1% de tritón x100 y 10% de DMSO a pH 10.5 ajustado con NaOH) durante 3 h a 4°C.

Una vez transcurrido el tiempo de lisis se sacó el portaobjetos y se sumergieron en la solución de electroforesis (0.4 M NaOH) durante 20 minutos a 300 mA y 25 V. los portaobjetos se lavaron entonces con la solución de neutralización (Tris-HCl 0.4 M, Ph 7.5), se secaron a temperatura ambiente y se fijaron con la solución fijadora (etanol-lisis, 1:1) durante 10 minutos.

Los portaobjetos se secaron nuevamente y se almacenaron previo a la tinción con bromuro de etidio (0.25 mg/L).

El alcance y distribución del daño al DNA se evaluó mediante la selección azar de 100 células (50 células/portaobjeto codificado) por animal, en un análisis ciego.

Las células fueron clasificadas visualmente de acuerdo a las siguientes clases:

- Clase 0: sin cola
- Clase 1: cola más corta que la cabeza (núcleo)
- Clase 2: cola de 1 a 2 veces el diámetro de la cabeza
- Clase 3: longitud de cola más grande de 2 veces el diámetro de la cabeza

El número total de cometas se determinó con la Ec. 8:

$$\text{Total de cometas} = [(\% \text{ de células clase } 0 * 0) + (\% \text{ de células clase } 1 * 1) + (\% \text{ de células clase } 2 * 2) + (\% \text{ de cometas clase } 3 * 3)]$$

Ec. 8

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar. Se realizaron pruebas de análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias entre los tratamientos. Posterior al ANOVA significativo se efectuó la prueba de comparaciones múltiples de Fisher-LSD o la prueba de Dunnet (comparaciones post hoc). Se estableció un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa STATISTICA v. 7

Para la determinación de las condiciones de extracción se realizó un diseño experimental factorial 2x3x3 en el proceso de extracción donde se trabajó con las siguientes variables:

- 2 especies: *P. durangensis* y *Q. sideroxyla*
- 3 relaciones masa/solvente: 1/10, 1/20, 1/30
- 3 concentraciones de solvente: etanol-agua: 20%, 50% y 80%

8. RESULTADOS

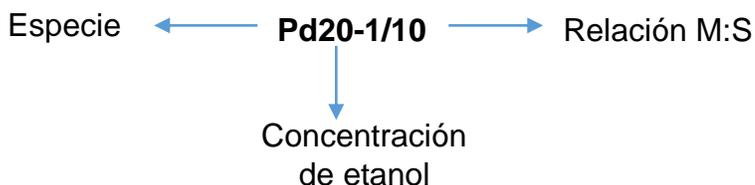
8.1 Obtención de extractos crudos y orgánicos de las cortezas de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*; y la evaluación de la concentración de polifenoles

8.1.1 Evaluación de extractos

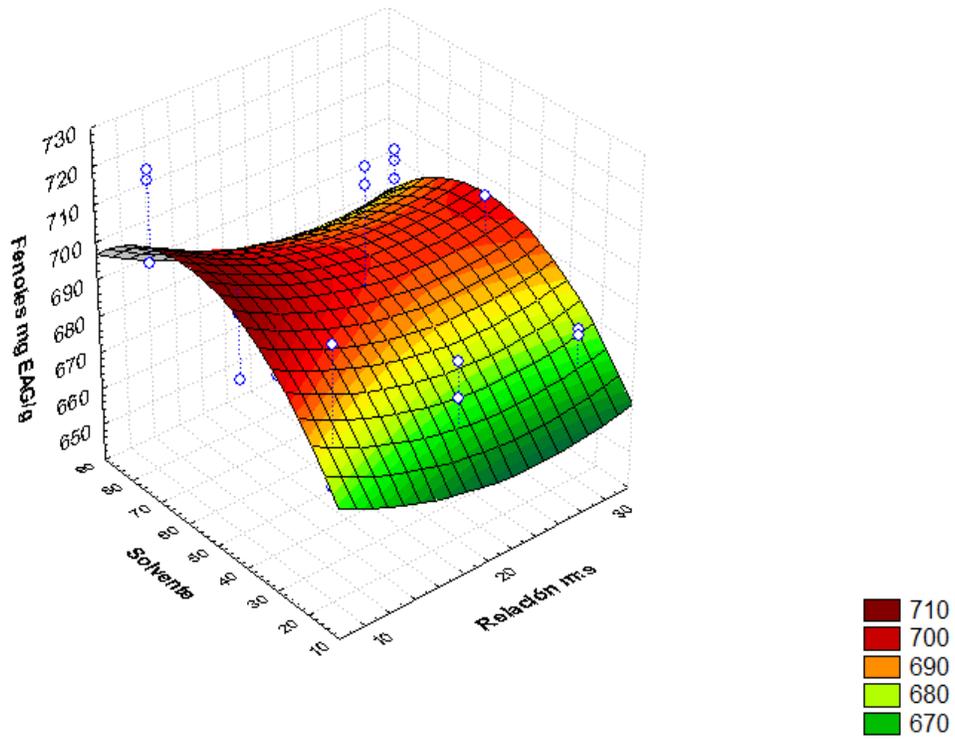
Inicialmente se evaluó el efecto del solvente y (M: S), sobre la extracción de compuestos bioactivos. El objeto de esto fue el obtener las mejores condiciones de extracción, las cuales estuvieron en función de: la caracterización fenólica (FT, FL, PACS), el % rendimiento (sólidos extraíbles) y la actividad antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP) de los extractos.

En total se obtuvieron 18 extractos para ambas especies, resultado de la matriz del diseño factorial 2x3x3.

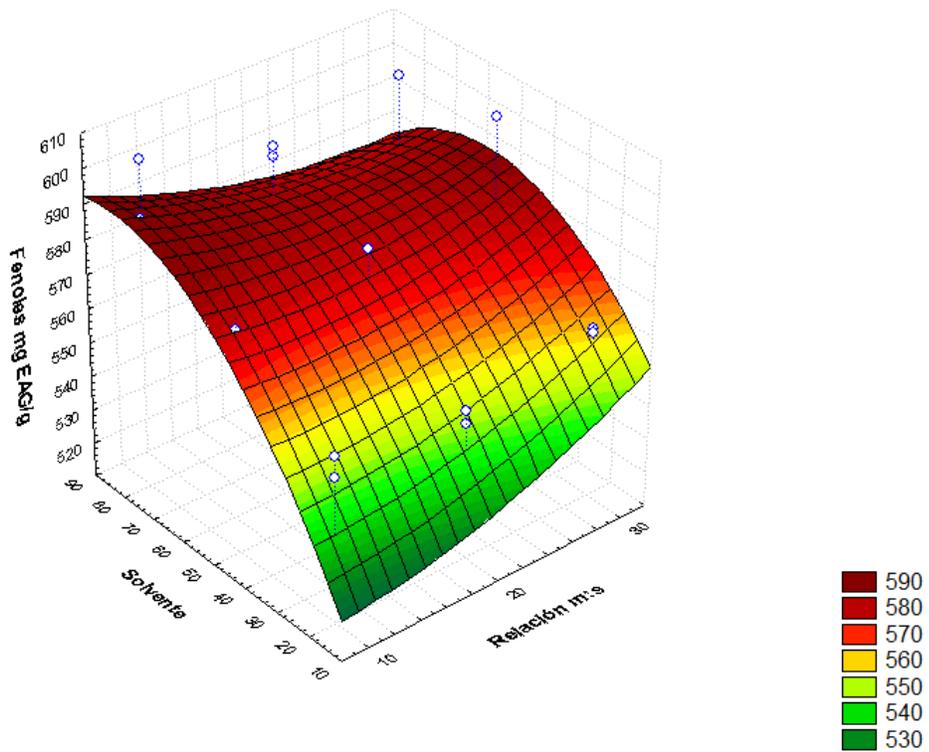
La clave que se representa a cada extracto es:



El efecto de la concentración de etanol y la relación M: S sobre la extracción de fenoles totales (FT) en las cortezas de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* se muestran en las **Figura 6**. La cantidad máxima de FT en *P. durangensis* se obtuvo en PdE80-1/10, con valor de 712.36 ± 13.4 mg EAG/g, aunque sin diferencia estadística con PdE50-1/20 con valor de 710.85 ± 17.7 mg EAG/g. En esta especie, el etanol al 20% fue el solvente con el que obtuvieron las menores concentraciones de FT. En la especie *Q. sideroxylla* la concentración máxima de FT fue de 592.97 ± 10.6 mg EAG/g en QsE80-1/10, similar a QsE80-1/30 de 590.09 ± 18.6 mg EAG/g. Al igual que en *P. durangensis*, la concentración de etanol al 20% fue la que tuvo las menores concentraciones de FT. La relación corteza/volumen de solvente (M:S) no tuvo un efecto significativo ($p \leq 0.05$, Fisher-LSD) en la extracción de FT, en ninguna de las especies de estudio.



a) *P. aurangensis*



b) *Q. sideroxylla*

Figura 6. Contenido fenólico de extractos de *P. durangensis* (a) y *Q. sideroxylla* (b)

Las concentraciones de FL y PACS de los extractos se presentan en la **Figura 7**. La concentración de FL en *P. durangensis* fue de 492.62 ± 21.9 mg EC/g en PdE50-1/20 de 614.68 ± 8.1 mg EC/g en PdE20-1/10, en la cual se observa que al incrementar la concentración de agua, tiende a incrementar el contenido de FL. En *Q. sideroxylla* la concentración fue de 318.97 ± 15.8 mg EC/g en QsE50-1/30 a 385.95 ± 22.2 mg EC/g en QsE80-1/10, en esta especie se observa una tendencia de aumentar la concentración de FL al aumentar la concentración de etanol. La concentración de FL es significativamente mayor ($p \leq 0.05$; Fisher-LSD) en la corteza de *P. durangensis* con respecto a *Q. sideroxylla*. En tanto, la concentración máxima de PACS en *P. durangensis* fue de 318.17 ± 4.4 mg EC/g en PdE20-1/10, la mínima de 272.06 ± 2.5 mg EC/g en PdE80-1/30. En *Q. sideroxylla* la concentración máxima fue de 319.83 ± 3.3 mg EC/g en QsE20-1/30, y la mínima de 267.61 ± 2.5 mg EC/g en QsE80-1/20. La concentración de etanol y la relación M: S utilizada tuvieron efecto significativo en la concentración de FL y PACS ($p < 0.05$; Fisher-LSD), en ambas especies. La concentración de PACS en las dos especies de estudio fue similar, aunque *P. durangensis* contiene una mayor cantidad de FL.

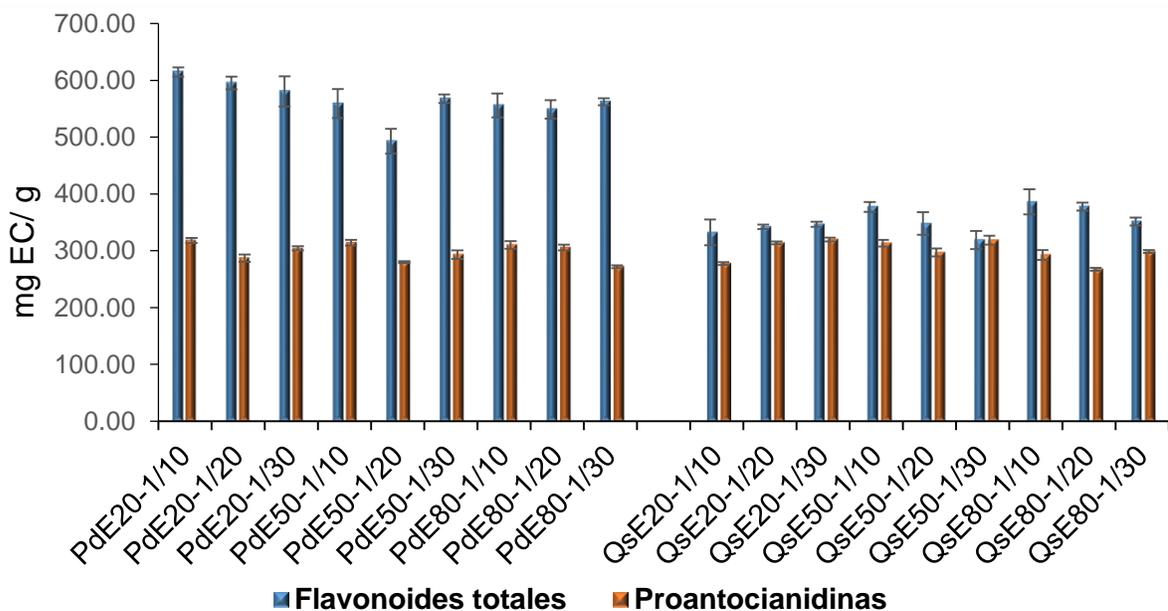


Figura 7. Contenido de flavonoides y proantocianidinas en extractos de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, obtenidos con los diferentes tratamientos de extracción

Los rendimientos de extracto (sólidos totales extraídos, % p/p), de los diferentes tratamientos de extracción aplicados a las cortezas de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* se presentan en la **Cuadro 2**. De acuerdo con el análisis estadístico existen diferencias significativas ($p < 0.05$, LSD) en el rendimiento entre los solventes de extracción para la especie de *P. durangensis*, en la cual el mayor rendimiento se obtuvo con el solvente de etanol al 50% (PdE50-1/20), con $28.72 \pm 0.9\%$; mientras que el rendimiento menor fue de $14.34 \pm 0.3\%$ con el solvente de etanol al 20% (PdE20-1/20). En la corteza de *Q. sideroxylla* se observa una tendencia de disminución de sólidos extraíbles conforme se aumenta la concentración de etanol, de tal forma que la muestra con solvente al 80% (QsE80-1/10) mostró el menor rendimiento de extracción de sólidos, con $19.15 \pm 0.3\%$, mientras que la de etanol al 50% (QsE50-1/30) tuvo el mayor rendimiento ($24.95 \pm 1.2\%$). La relación M:S empleada tuvo efecto significativo ($p < 0.05$, F-LSD) en PdE20 y PdE50, entre las relaciones 1/10, 1/20 y 1/30 m/v, mientras que en *Q. sideroxylla* las diferencias fueron entre QsE50 y QsE80.

Con respecto a los resultados de porcentaje de inhibición de los radicales libres, en el **Cuadro 2** se presentan los resultados de los extractos obtenidos de los diferentes tratamientos de extracción, así como de los flavonoides catequina y taxifolina, que se utilizaron como estándares de referencia.

Para determinar la eficacia de los antioxidantes, se han utilizado tres métodos para evaluar la actividad antioxidante debido a su simplicidad, estabilidad y precisión, con esto se encontró que la concentración de etanol y la relación M:S tuvieron efecto significativo en la capacidad antioxidante de los extractos, en los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP ($P < 0.05$, F-LSD). En *P. durangensis* la mayor capacidad antioxidante se obtuvo con el extracto PdE20-1/30, mientras que en *Q. sideroxylla* fue en QsE50-1/10.

Considerando el promedio de los nueve tratamientos realizados para cada una de las especies, en *P. durangensis* se obtuvo un porcentaje de atrapamiento del radical DPPH de 54.12%, así como de 60.83% en ABTS y 439.66 μM EAA para FRAP, mientras que en *Q. sideroxylla* los promedios fueron de 51.31% en DPPH, 64.41% en ABTS y 434.01 μM EAA en FRAP. Los resultados en DPPH y FRAP son similares en ambas especies, y en ABTS la corteza de *Q. sideroxylla* tiene mayor actividad. Para

los flavonoides de referencia los resultados en DPPH fueron de 69.88% en catequina y 67.85% en taxifolina, por la técnica de ABTS la inhibición mostrada por catequina fue de 88.64%, mientras que en taxifolina fue de 39.16%.

Cuadro 2. Rendimiento de sólidos y capacidad antioxidante de las cortezas de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*

Muestra	% Rendimiento (sólidos)	% Inhibición DPPH	% Inhibición ABTS	FRAP µM EAA
<i>PdE20-1/10</i>	18.5± 0.4 ^c	59.6±0.1 ^c	61.04±3.2 ^d	473.87±1.0 ^a
<i>PdE20-1/20</i>	14.3±0.3 ^e	52.4±0.2 ^f	58.31±0.9 ^e	445.20±2.0 ^c
<i>PdE20-1/30</i>	16.5±0.3 ^d	63.58±3.7^b	67.73±1.7^b	474.53±3.0^a
<i>PdE50-1/10</i>	27.1±2.4 ^a	55.86±3.6 ^d	61.43±3.1 ^d	458.87±0.9 ^b
<i>PdE50-1/20</i>	28.72±0.9^a	49.68±3.5 ^g	57.86±1.0 ^f	435.20±4.6 ^d
<i>PdE50-1/30</i>	22.4±0.3 ^b	53.57±2.2 ^e	58.31±1.6 ^e	399.20±2.8 ^g
<i>PdE80-1/10</i>	23.5±0.4 ^b	52.02±2.7 ^f	62.14±0.5 ^c	438.53±1.9 ^d
<i>PdE80-1/20</i>	19.6±2.6 ^c	50.05±0.6 ^f	58.77±0.5 ^e	443.20±2.0 ^c
<i>PdE80-1/30</i>	22.9±0.5 ^b	50.32±0.4 ^f	61.88±0.4 ^c	422.53±4.4 ^e
<i>QsE20-1/10</i>	21.6±1.4 ^{bc}	46.92±1.6 ^e	64.29±3.6 ^d	398.53±7.5 ^g
<i>QsE20-1/20</i>	21.9±0.2 ^{bc}	46.34±1.2 ^e	58.64±2.5 ^f	383.53±8.9 ^g
<i>QsE20-1/30</i>	24.5±1.5 ^a	52.91±3.7 ^d	62.86±1.3 ^e	441.20±8.8 ^c
<i>QsE50-1/10</i>	20.9±0.8 ^{cd}	55.70±2.4^b	69.35±0.9^b	472.85±4.1^a
<i>QsE50-1/20</i>	22.2±0.1 ^{bc}	53.20±1.2 ^c	68.05±0.2 ^b	429.87±7.5 ^d
<i>QsE50-1/30</i>	24.95±1.2^a	51.10±0.9	64.16±4.0 ^e	459.30±5.3 ^{ab}
<i>QsE80-1/10</i>	19.15±0.3 ^e	54.71±3.6 ^b	64.74±0.5 ^e	430.20±4.2 ^d
<i>QsE80-1/20</i>	20.3±0.04 ^{de}	53.90±0.9 ^c	67.01±0.2 ^c	473.50±1.4 ^a
<i>QsE80-1/30</i>	22.4±0.7 ^b	47.03±1.6 ^e	60.58±3.8 ^f	416.20±5.1 ^e
Catequina	---	69.88±1.0 ^a	88.64±3.1 ^a	453.53±8.0 ^b
Taxifolina	---	67.85±1.4 ^a	39.16±3.5 ^g	406.87±5.1 ^f

Los valores representan la media ± desviación estándar de n=4. Diferente literal en columna, representa diferencia significativa entre extractos p≤0.05, Fisher-LSD.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se eligió etanol al 50 % como solvente de extracción y las relación M: S de 1/30 y 1/10 como parámetros de extracción para la obtención de extractos crudos de corteza de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* respectivamente.

8.1.2 Evaluación de extractos crudos y orgánicos de las cortezas de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* aplicando las mejores condiciones de extracción

Se obtuvieron 2 extractos por especie, un crudo (EC) y un orgánico (EO), a los cuales se les realizó la caracterización fenólica, la cual se muestra en la **Figura 8**.

Los extractos orgánicos de ambas especies, presentaron una mayor concentración fenólica, FL y PACS, en comparación al extracto crudo, encontrando diferencias significativas entre EC y EO, y entre especies ($p \leq 0.05$, Fisher-LSD). PdEO obtuvo la mayor concentración de FT y FL (827.15 EAG/g ± 10.44 ; 690.12 EC/g ± 0.068 respectivamente). Se obtuvo una concentración importante de FL en los 4 extractos (superior al 50% con base a FT). Para PACS se obtuvo la concentración mínima con PdEO (197.8 $\pm .07$) y la máxima con QsEO (508.8 ± 0.06).

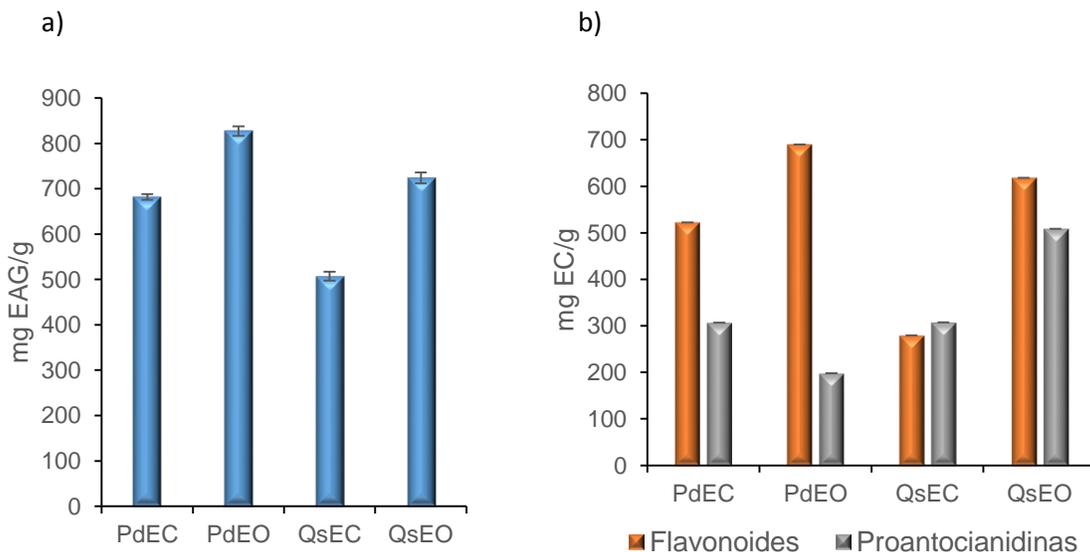


Figura 8. Evaluación polifenólica de extractos crudos y orgánicos de corteza de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, (a) Fenoles totales, (b) Flavonoides y proantocianidinas

8.2 Identificación de los principales polifenoles en los extractos para verificar la reproducibilidad de éstos en las especies

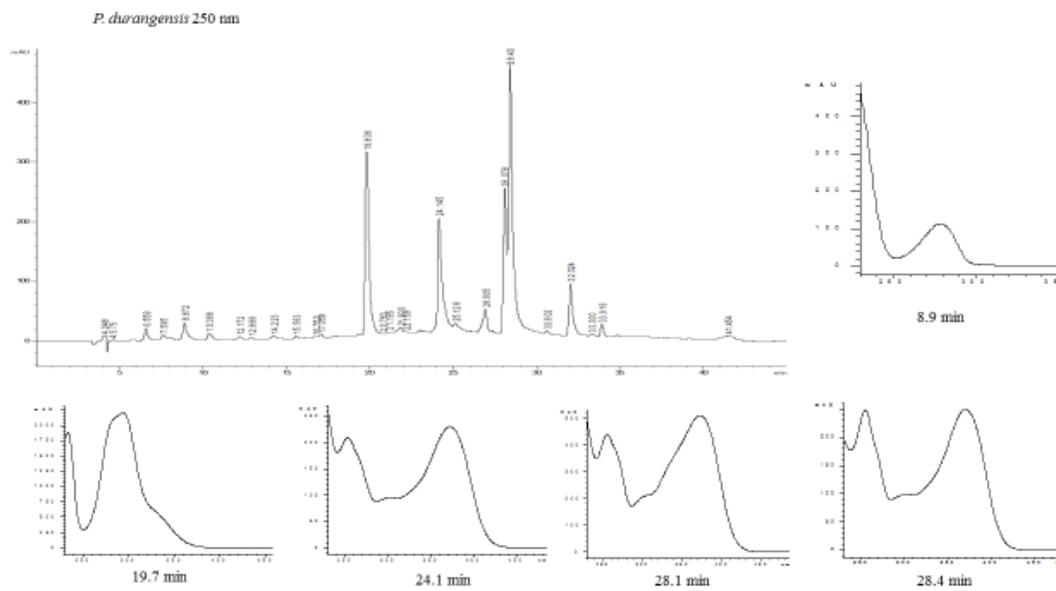
8.2.1 Identificación de metabolitos mediante HPLC-UV

En la **Figura 9** se muestran los cromatogramas de HPLC, monitoreados a una longitud de onda de 250 nm, de extractos de corteza de *P. durangensis* (a) y *Q. sideroxylla* (b), así como de los espectros de UV de los picos con mayor intensidad, en *P. durangensis* a tiempos de retención de 8.9, 19.7, 28.1 y 28.4 min, y en *Q. sideroxylla* a tiempos de 4.5, 6.5, 8.9, 19.7 y 22.2 min.

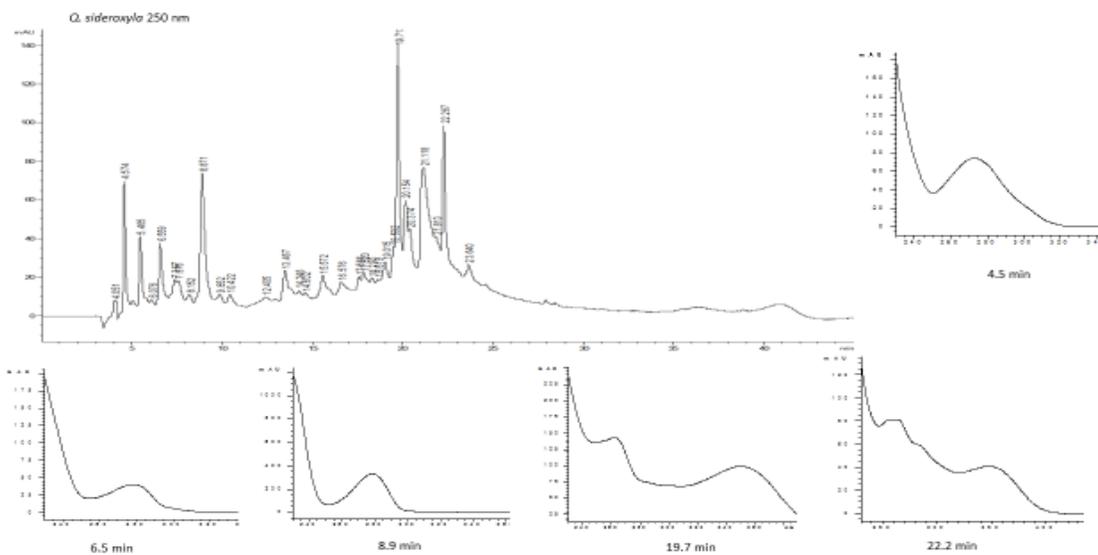
En la **Cuadro 3** se presentan los datos relacionados con el tiempo de retención de los compuestos (cromatogramas de HPLC), monitoreados a longitudes de onda de 250, 280 y 370 nm, la intensidad de las señales de los picos y las señales de UV de los compuestos.

En *P. durangensis* se tienen señales de UV correspondientes a derivados del grupo de las catequinas (6.5 min), catequina (8.9 min), un flavonoide de tipo dihidroflavonoide o flavanona (19.7 min), así como señales que corresponden a compuestos de tipo flavonol (28.1 y 28.4 min).

En *Q. sideroxylla* el compuesto a 4.5 min puede corresponder a ácido gálico, los de 5.4 y 6.5 min, con absorbancias a 278 nm son compuestos de tipo flavan-3-ol, el de 8.9 min corresponde a catequina y por las señales de UV que presentan los compuestos a 19.7 y 22.2 min., corresponden a flavonoles.



a) HPLC de *P. durangensis* a 250 nm, y espectros de UV de picos a 8.9, 19.7, 24.1, 28.1 y 28.4 min



b) HPLC de *Q. sideroxylo* a 250 nm, y espectros de UV de picos a 4.5, 6.5, 8.9, 19.7 y 22.2 min.

Figura 9. Cromatograma de HPLC a 250 nm de extractos de corteza de *P. durangensis* y *Q. sideroxylo*, y espectros de UV de los picos con mayor intensidad

Cuadro 3. Tiempos de retención de los compuestos determinados por HPLC-UV de extractos hidroetanólicos de las cortezas de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*

Tiempo retención (min)	λ_{250}	λ_{280}	λ_{370}	Señales de UV	Compuesto sugerido
<i>P. durangensis</i>					
6.5	+	+		278	Flavan-3-ol (catequinas)
8.9	+	+		278	Catequina
10.3	+	+		278	Flavan-3-ol (catequinas)
19.7	+++	++++		290, 335sh	Dihidroflavonoide (Taxifolina)
24.1	+++		+++	250, 260sh, 370	Flavonol
28.1	+++		+++	252, 290sh, 370	Flavonol
28.4	++++		++++	252, 270sh, 370	Flavonol
<i>Q. sideroxylla</i>					
4.5	+++	+++		270	Acido gálico
5.4	++	++		278	Flavan-3-ol (catequinas)
6.5	++	++		278	Flavan-3-ol (catequinas)
8.9	+++	++++		278	Catequina
19.7	++++		++++	265, 350	Flavonol
22.2	+++		+++	258, 285sh, 350	Flavonol

Intensidad del pico: + muy baja, ++ baja, +++ alta, ++++ muy alta

8.2.2 Identificación de metabolitos mediante HPLC-ESI-MS

La caracterización de EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* fue realizada con el análisis de los picos principales, los cuales fueron identificados en base al orden de elución durante el análisis. Todos los compuestos fueron caracterizados por la interpretación del espectro de masa obtenido por HPLC-ESI-MS; y también tomando en cuenta datos previamente reportados. La **Figura 10** (A y B) muestra el cromatograma de iones totales (TIC) de los extractos de ambas especies de estudio.

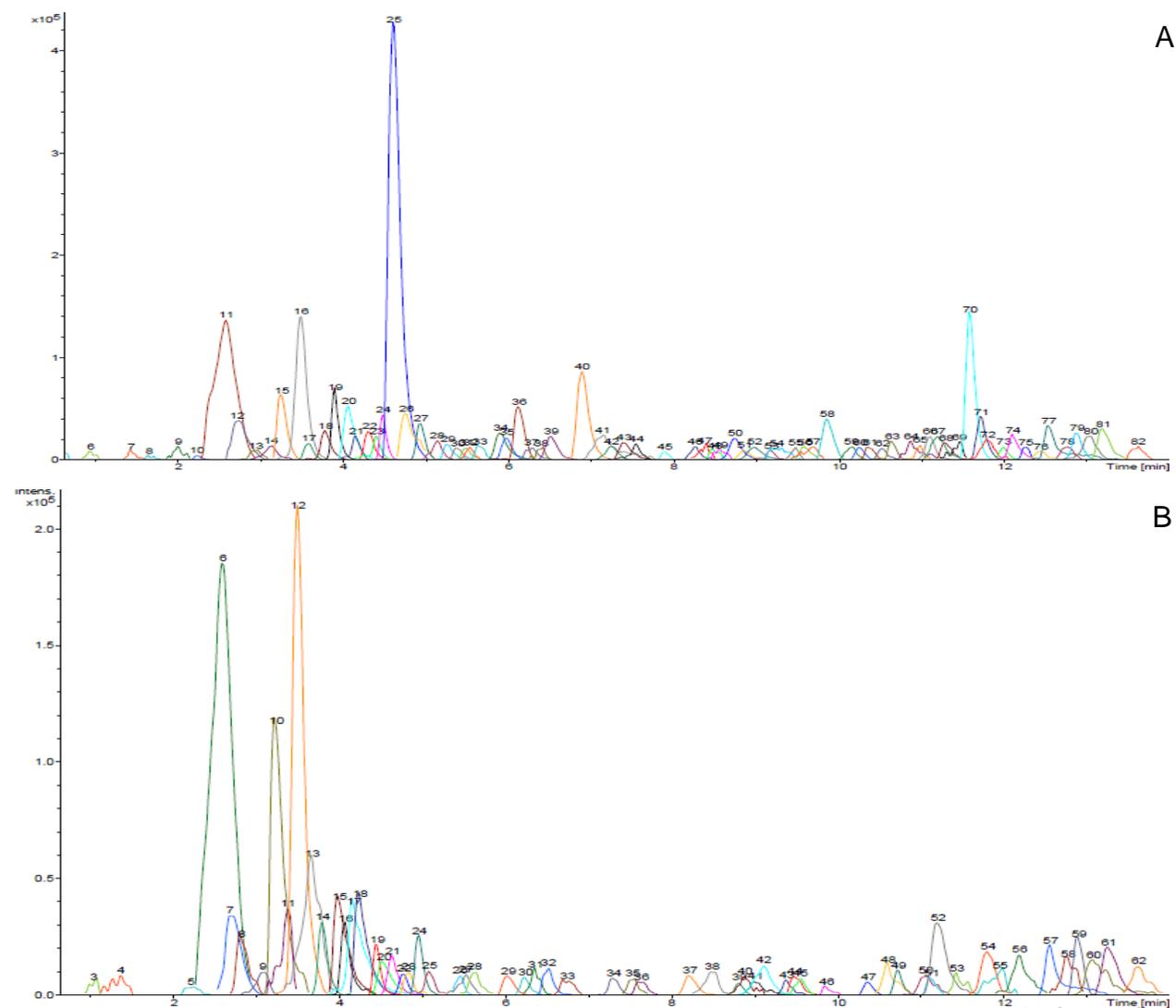


Figura 10. Cromatograma de iones totales de EO de *P. durangensis* (A) y *Q. sideroxylla* (B)

Se encontró la presencia de taxifolina en EO *P. durangensis*, y PACS. Otros componentes encontrados en el cromatograma, se compararon con la literatura pertinente para obtener una identificación tentativa (principalmente estudios sobre compuestos de corteza del género *Pinus* y *Quercus* (**Cuadro 4 y 5**).

Cuadro 4. Compuestos identificados por ESI-MS en EO de *P. durangensis*

# Pico	TR (min)	Masa [m/z]-	Compuesto sugerido
11	2.6	577.132	Dímero de proantocianidina
12	2.7	289.0699	(+)-Catequina/(-)-Epicatequina
15	3.3	577.1321	Dímero de proantocianidina
15	3.3	865.1916	Trímero de procianidina
16	3.5	289.0706	(+)-Catequina/(-)-Epicatequina
16	3.5	579.149	Dímero de catequina
19	3.9	465.1041	Taxifolina-O-hexósido
25	4.6	303.0506	Dihidroquercetina (Taxifolina)
34	5.9	633.121	HHDP-galoyl-glucosa
36	6.1	317.0616	Miricetina
36	6.1	635.1369	Trigaloyl glucosa
39	6.5	287.0539	Eriodictiol
40	6.9	317.0639	Miricetina
40	6.9	635.1369	Trigaloyl glucosa
41	7.1	331.0448	Pinomiricetina (miricetina-6Me)
50	8.7	357.133	b-hidroxypropiovanilona glucosido
58	9.9	301.0679	Quercetina
58	9.9	603.144	(Epi)catequina-3-O-glucósido-galato
70	11.6	285.0759	Kaemferol
77	12.5	311.1854	Acido-t-caftárico
79	12.9	293.174	Desconocido

El perfil fenólico identificado para EO de *Q. sideroxylla* se muestra en el **Cuadro 5**.

Se identificaron compuestos como dímeros de procianidinas, catequina/epicatequina (picos 6, 10,12 y 13) quienes fueron los compuestos más abundantes en el extracto. Otros compuestos presentes en el EO de esta especie se compararon con literatura pertinente para su identificación tentativa, También se encontraron compuestos desconocidos aún, pero cuya presencia (espectro de masa) ha sido previamente reportada en estudios sobre corteza.

Cuadro 5. Compuestos identificados por ESI-MS en EO de *Q. sideroxylla*

# Pico	TR (min)	Masa [m/z]-	compuesto sugerido
6	2.6	577.1319	Dímero de proantocianidina
7	2.7	289.0702	(+)-Catequina/(-)-Epicatequina
10	3.2	577.1323	Dímero de proantocianidina
12	3.5	579.1489	Dímero de proantocianidina
13	3.7	289.0702	(+)-Catequina/(-)-Epicatequina
14	3.8	577.1307	Dímero de proantocianidina
15	4	463.0873	Quercetina 3-O-glucósido
18	4.2	447.092	Ácido gálico--ramnósido
21	4.6	303.0498	Dihidroquercetina
37	8.2	331.249	ácido gálico hexóxido
57	12.5	311.1848	Ácido t-caftárico
59	12.9	293.1736	Desconocido

Los espectros analizados de los extractos orgánicos de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, se encuentran en el Anexo A.

8.3 Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos con métodos *in vitro* y mediante el método de lipoperoxidación hepática *in vivo*

8.3.1 Evaluación antioxidante *in vitro*

Los resultados obtenidos del análisis de la actividad antioxidante de los EC y EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, se encuentran en el **Cuadro 6**.

Cuadro 6. Evaluación antioxidante *in vitro* de EC y EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*

Extracto	DPPH % ARL	ABTS % ARL	FRAP μM EAA
PdEC	65.64 ± 0.01 ^e	82.37 ± 0.55 ^c	460.09 ± 1.54 ^d
PdEO	93 ± 0.35 ^b	98.10 ± 1.03 ^a	662.53 ± 11.31 ^b
QsEC	51.80 ± 0.50 ^f	74.69 ± 7.4 ^d	496.98 ± 1.54 ^c
QsEO	100 ± 0.22 ^a	99.10 ± 1.02 ^a	876.5 ± 6.60 ^a
Catequina	71.51 ± 7.39 ^d	96.14 ± 4.22 ^b	453.53 ± 8.01 ^e
Taxifolina	79.78 ± 1.39 ^c	59 ± 5.17 ^e	406.87 ± 5.19 ^f

Los valores representan la media ± desviación estándar de n=4. Diferente literal en columna, representa diferencia significativa p≤0.05, Fisher-LSD.

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas p ≤0.05 en la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos. Los extractos en general tuvieron efecto en el atrapamiento de radicales libres, al presentar mejores resultados en comparación a los estándares empleados.

Los EO de ambas especies exhibieron mayor actividad antioxidante en comparación a los EC (en los tres ensayos evaluados), en tanto que el EO de *Q. sideroxylla* es el que ejerció una mayor actividad antioxidante en todos los ensayos utilizados.

8.3.2 Evaluación antioxidante *in vivo*

La evaluación antioxidante *in vivo* se observa en el **Cuadro 7** en donde se enlistan los resultados de los dos modelos patológicos analizados.

Se observó una importante acción antioxidante por parte de los extractos de las especies de estudio a las dosis evaluadas. En el caso del modelo de diabetes inducida, se encontraron niveles mayores de lipoperoxidación en los grupos de diabetes y diabetes con administración de extracto; además el extracto QsEO50 disminuyó significativamente la oxidación hepática comparada con el control positivo e incluso con el control negativo.

Cuadro 7. Evaluación antioxidante *in vivo* de EC y EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*

Grupo experimental	Modelo Diabetes MDA (mM/g tejido)	Modelo Hipercolesterolemia (MDA mM/g tejido)
Control negativo	9.60 ± 1.51	3.403 ± 0.74
Control positivo	14.59 ± 1.54 ^a	8.91 ± 0.58 ^a
PdEC50	_____	14.16 ± 4.38 ^{ab}
PdEO50	10.37 ± 1.58 ^a	6.69 ± 0.68 ^a
PdEC100	_____	12.7 ± 1.09 ^{ab}
PdEO100	_____	5.15 ± 0.71 ^b
QsEC50	10.15 ± 0.85 ^a	10.43 ± 0.67 ^a
QsEO50	7.46 ± 1.05 ^{a, b}	6.3 ± 0.38 ^{ab}
QsEC100	_____	9.3 ± 2.49 ^a
QsEO100	_____	4.42 ± 1.56 ^b

Representan la media ± la SD de n= 5. Se realizó ANOVA una vía y prueba post hoc Dunnett a p≤0.05. a: expresa diferencia significativo vs control negativo b: expresa diferencia significativo vs control positivo a p≤0.05

Con respecto a los resultados de la actividad de los extractos de ambas especies sobre los niveles de lipoperoxidación en el modelo murino de hipercolesterolemia, se encontró que el extracto PdEC50 y PdEC100 aumentaron significativamente la oxidación comparada con el grupo de hipercolesterolemia (control positivo) y el control negativo, mientras que la mayoría del resto de los extractos tanto de *P. durangensis* como *Q. sideroxylla* disminuyeron significativamente la lipoperoxidación hepática comparada con el control positivo; y sólo QsEO100 disminuyó la concentración de MDA a niveles del grupo control negativo.

8.4 Evaluación del efecto hipoglucemiante e hipocolesterolemiante en modelo murino; y la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa *in vitro*

8.4.1 Evaluación de la Inhibición de la enzima α -amilasa *in vitro*

Los EC y EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, mostraron efecto inhibitorio *in vitro* sobre la enzima α -amilasa (**Figura 11**). Los EO de ambas especies son quienes expresaron mayor actividad inhibitoria de la enzima al tener una CE₅₀ menor (PdEO 1020.9 $\mu\text{g}/\text{mL} \pm 21.6$; QsEO 1703.3 $\mu\text{g}/\text{mL} \pm 38.1$) incluso en comparación al control de referencia empleado (acarbosea 4030.1 $\mu\text{g}/\text{mL} \pm 24.4$). Todos los extractos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos y en comparación al control de acarbosea ($p \leq 0.05$, Fisher-LSD).

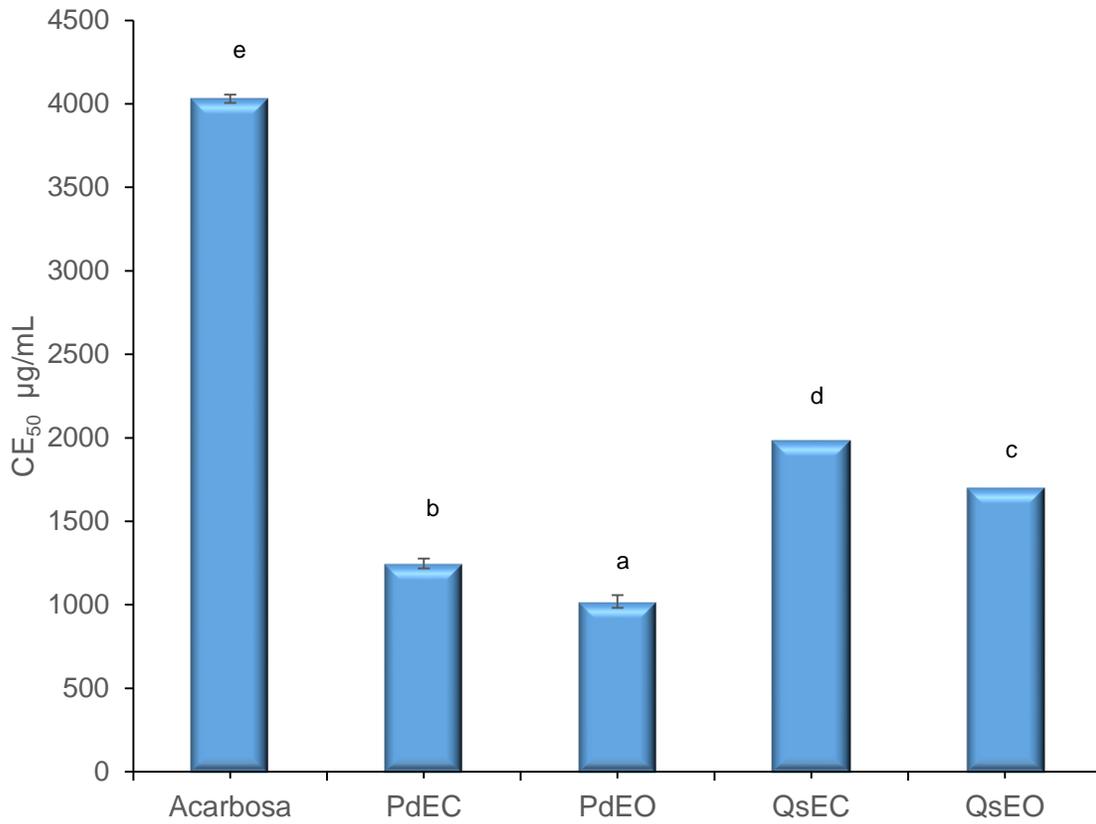


Figura 11. CE₅₀ del efecto inhibitorio de EC y EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* sobre la enzima α -amilasa

Diferente literal en columna, representa diferencia significativa $p \leq 0.05$, Fisher-LSD.

8.4.2 Evaluación de la Inhibición de la enzima α -glucosidasa *in vitro*

El efecto inhibitorio de los EC y EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* se muestra en la **Figura 12**.

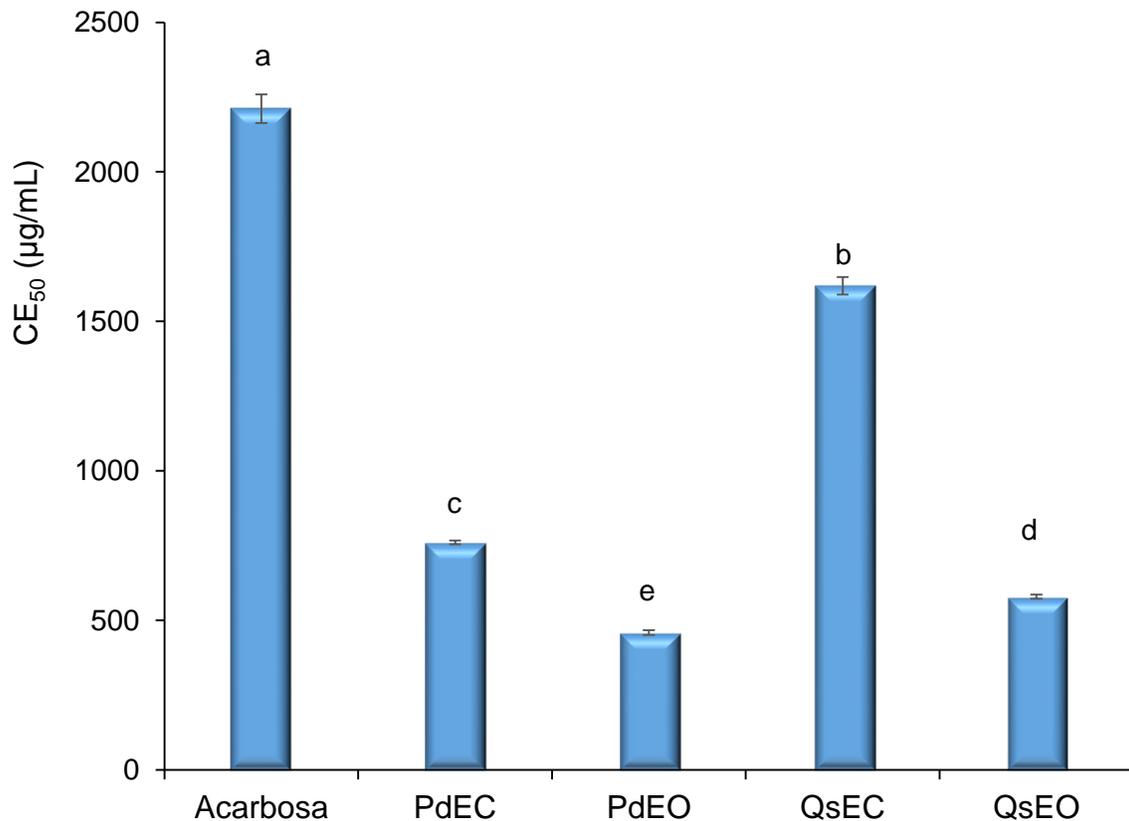


Figura 12. CE₅₀ del efecto inhibitorio de EC y EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* sobre la enzima α -glucosidasa

Diferente literal en columna, representa diferencia significativa $p \leq 0.05$, Fisher-LSD.

Ambos extractos de las especies en análisis tuvieron un importante efecto inhibitorio sobre la enzima. Se obtuvieron diferencias estadísticas significativas entre los EC y EO y entre especie ($P \leq 0.05$ Fisher-LSD); sin embargo nuevamente los EO de *P.*

durangensis y *Q. sideroxylla* muestran mayor actividad en comparación a sus extractos crudos. PdEO fue quien manifestó la mayor actividad al tener una CE_{50} de $459.5 \mu\text{g/mL} \pm 7.76$. La acarbosa que fungió como control de referencia mostró la menor actividad inhibitoria ($2210.9 \mu\text{g/mL} \pm 48.04$) frente a todos los extractos.

8.4.3 Evaluación del efecto hipoglucemiante *in vivo*

8.4.3.1 Actividad hipoglucemiante

Los resultados de la curva de tolerancia a la glucosa en cada grupo experimental de ambas especies, se muestran en la **Figura 13**.

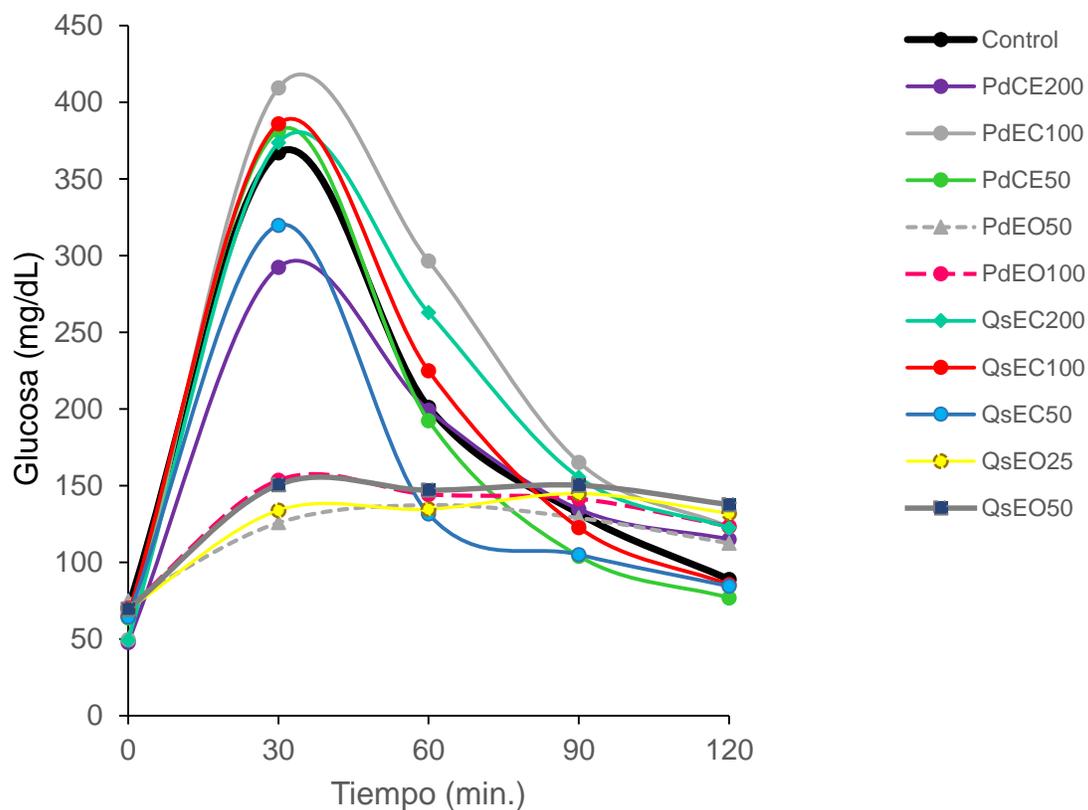


Figura 13. Curva de tolerancia a la glucosa de CE y EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*

Como se observa, los EO de ambas especies mostraron un comportamiento similar en donde exhibieron actividad hipoglucemiante. Para clarificar los resultados de esta actividad se calculó el área bajo la curva (AUC) que exhibe cada grupo, lo cual se resume en el **Cuadro 8**.

Cuadro 8. Área bajo la curva de la actividad hipoglucemiante de los extractos de *P. duragensis* y *Q. sideroxylla*

Grupo	AUC (mg/dL * min.)
Control	233.76 ±43.0
PdEC200	212.25±94.9
PdEC100	287.19±45.5
PdEC 50	224.14±37.9
PdEO 100	160.71±21.9 ^a
PdEO50	162.34±17.4 ^a
QsEC200	263.28±55.2
QsEC100	242.55±53.6
QsEC 50	189.15±14.9 ^a
QsEO25	154.17 ± 15.4 ^a
QsEO50	165.39±11.8 ^a

Los datos expresan la media ± la desviación estándar n=5. a : expresa mayor actividad vs control p≤ 0.05. Prueba Dunnett

Los resultados obtenidos indicaron que todos los EO y el EC de *Q. sideroxylla* a dosis de 50 mg/ kg peso corporal mostraron actividad hipoglucemiante al presentar AUC menor en comparación al grupo control (< 233.76 ±43.0 mg/dL x min).

Los EO de ambas especies y QsEC50 mostraron nula diferencia estadística entre sí ($p \leq 0.05$), por ello la elección de los extractos para la determinación del efecto farmacológico en el modelo de diabetes inducida fueron PdEO50, QsEO50 y QsEC50.

La elección se realizó con fines comparativos, esto para analizar la acción de todos los compuestos presentes en el EC, así como el efecto de un extracto con selectividad de componentes (EO), evaluado a la misma dosis.

8.4.3.2 Efecto hipoglucemiante en un modelo murino con diabetes inducida

Se evaluaron los extractos seleccionados del ensayo de actividad hipoglucemiante. En el **Cuadro 9** se encuentran los resultados de los niveles de glucemia durante el monitoreo realizado a los animales de cada grupo experimental.

Cuadro 9. Niveles de glucemia en ratas Wistar durante el tiempo de estudio

Grupo	Glucosa (mg/dL)			
	Día 1°	Día 3°	Día 6°	Día 10°
Control negativo	89.6±5.1	92±8.6	100.4±7.5	91±22.9
Control diabético	419.6±49.6 ^a	442.2±36.7 ^a	500±3.1 ^a	500±0 ^a
Diabetes + QsEC50	462±33.9 ^a	397.2±61.2 ^a	465.5±33.3 ^a	500± 0 ^a
Diabetes + QsEO50	397 ± 10.4 ^{ab}	337.8 ±34.6 ^{ab}	372.6±7.54 ^{ab}	414.2±62.5 ^{ab}
Diabetes + PdEO50	393.8±40.8 ^{ab}	391.4±12.8 ^a	391.8±40.8 ^{ab}	455.4±40.8 ^a

Los datos representan la media ± SD; $n = 5$. a: indica diferencia estadística comparado con el grupo control negativo; b: en comparación al grupo diabético ($p \leq 0.05$; Dunnett).

Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre controles de referencia (negativo y diabético).

Los resultados demostraron que los EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* ejercen efecto sobre los niveles de glucosa, logrando mantenerlos más estables, además de mostrar un mayor efecto hipoglucemiante, en comparación al EC de *Q. sideroxylla*.

8.4.4 Evaluación del efecto hipocolesterolemiante en un modelo murino

En la **Figura 14** se muestran los resultados obtenidos del análisis del efecto hipocolesterolemiante de los extractos en estudio.

En general, la evaluación hipocolesterolemiante de EC y EO de las especies de estudio, demostró algunos efectos benéficos sobre los parámetros evaluados de colesterol total (CT), triglicéridos (TGC) y colesterol-HDL.

En la prueba de CT se observó que los EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, no manifiestan diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$; Dunnet) en comparación al grupo control negativo, siendo QsEO50 quien tuvo el mayor efecto hipocolesterolemiante (3.16 ± 0.33 mmol/L). Por otra parte se encontró que los EC de ambas especies a las dosis evaluadas tendieron a elevar las concentraciones de CT a niveles superiores del control positivo ($> 4.0 \pm 0.8$). Un efecto similar se observó en el ensayo de TGC, en donde los EC (exceptuando QsEC50) de ambas especies aumentaron los niveles séricos de TGC, siendo PdEC50 el tratamiento que más afectó dicho parámetro (18.18 mM/L \pm 1.90) y PdEO100, QsEO50 y QsEC50, quienes mostraron el mayor efecto hipolipemiante sobre TGC (4.87 mM/L \pm 1.7 ; 5.13 ± 1.5 mM/L; 1.42 Mm/L \pm 0.14).

En la determinación de HDL, todos los extractos analizados tuvieron concentraciones iguales o superiores de esa variable en suero sanguíneo, al ser comparados con el control negativo (≥ 0.595 mM/L \pm 0.10).

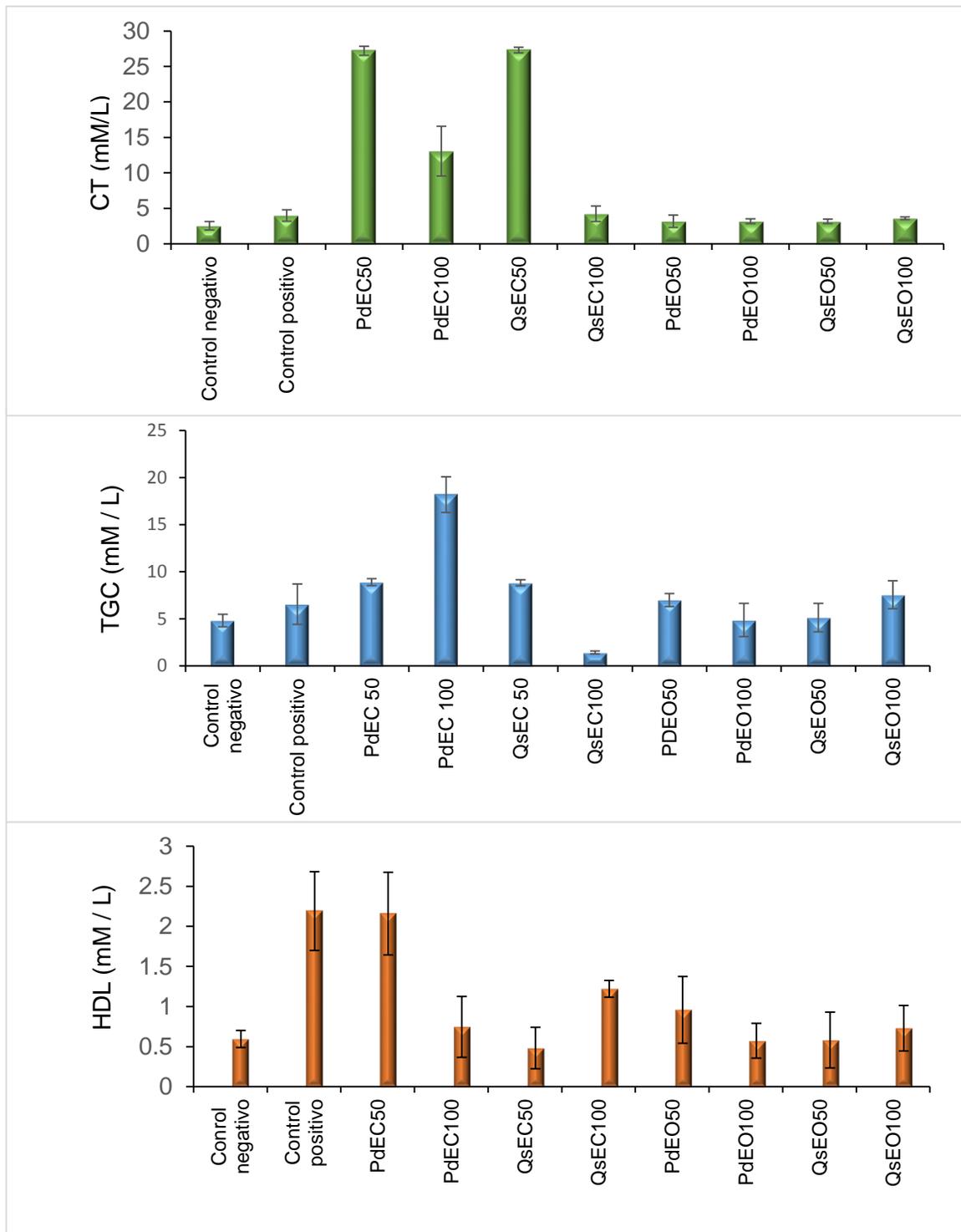


Figura 14. Resultados de la evaluación de efecto hipocolesterolemiante de EC y EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxyla*

8.5 Evaluación toxicológica

8.5.1 Determinación de DL₅₀

Los resultados se presentan en el **Cuadro 10**, como se puede observar no existió mortalidad inmediata ni posterior a las 24 h. La dosis letal media para ambas especies fue mayor a los 5000 mg/kg de peso corporal, reportada como DL₅₀ ≥ 5000 mg/kg. No existieron signos de toxicidad.

Cuadro 10. Evaluación de dosis letal₅₀ y signos tóxicos

Extracto	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad	Signos tóxicos			
			Convulsión	Diarrea	Pilo-erECCIÓN	Letargo
QsEC						
	1000	0/3	-----	-----	-----	-----
	2000	0/3	-----	-----	-----	-----
	3000	0/3	-----	-----	-----	-----
	5000	0/3	-----	-----	-----	-----
PdEC						
	1000	0/3	-----	-----	-----	-----
	2000	0/3	-----	-----	-----	-----
	3000	0/3	-----	-----	-----	-----
	5000	0/3	-----	-----	-----	-----

8.5.2 Evaluación citotóxica

El efecto citotóxico sobre la viabilidad celular se presenta en la **Figura 15**. Se evaluaron los efectos de EC y EO de *P. durangensis* y *Q sideroxya* en la línea celular de carcinoma de mama humano, MDA-MB-231 y la línea celular de carcinoma de cervix HeLa. Se emplearon líneas celulares no tumorales MCF-10A y HSF-1184 como

controles con el fin de comparar los efectos producidos por los extractos en células sanas y tumorales.

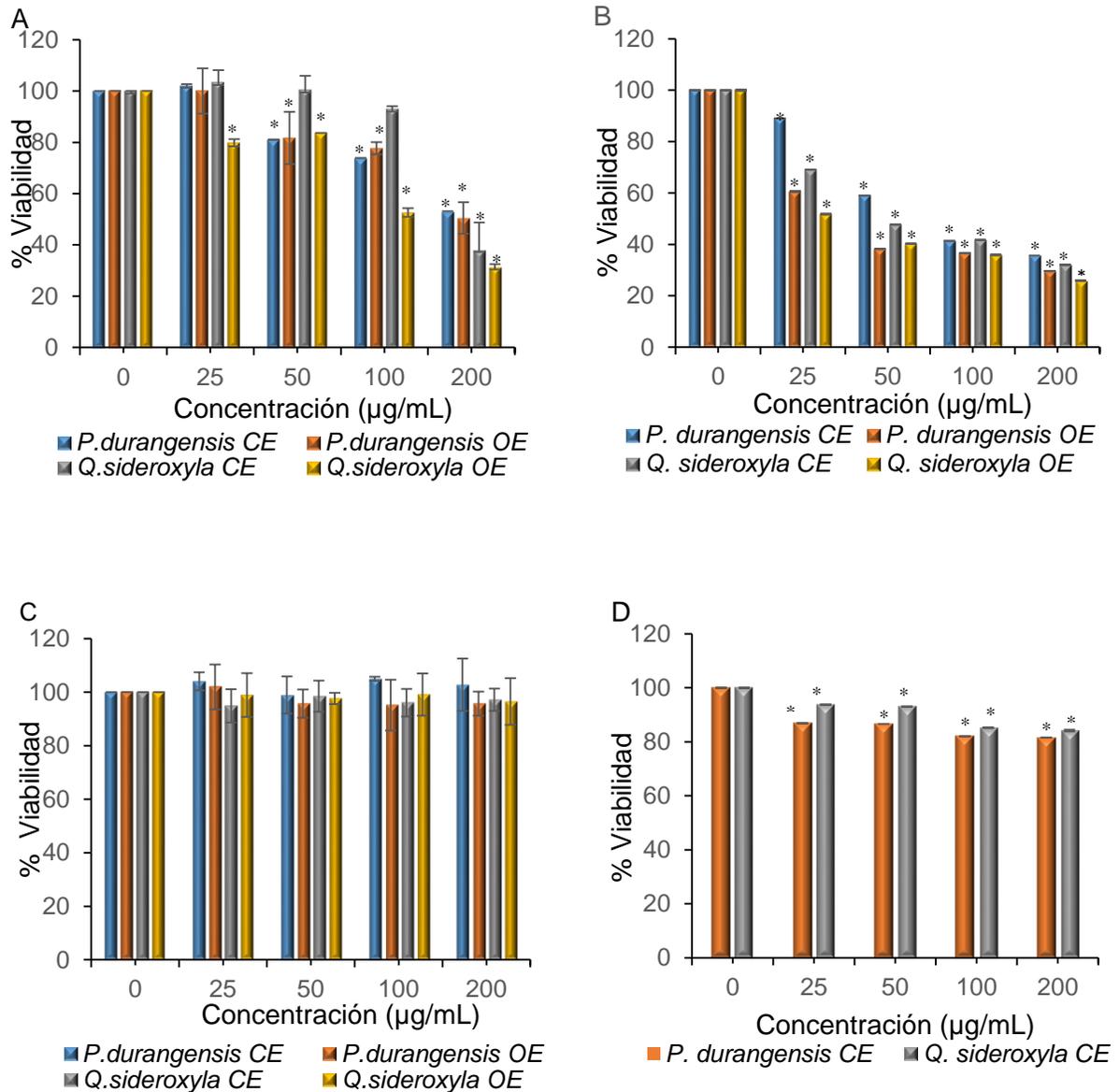


Figura 15. Efecto de extractos de corteza de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* sobre la viabilidad celular: (A) HeLa, (B) MDA-MB-231 (C) HSF-1184 y (D) MCF-10A. El porcentaje de la viabilidad celular en el grupo control (sin tratamiento) se consideró

como el 100%. Los resultados se expresaron como la media \pm SD de dos experimentos independientes (n = 4). Diferencia significativa * $p \leq 0.05$ comparada con el grupo control.

Los resultados mostraron que los EC y los EO de ambas especies redujeron la viabilidad celular de las líneas celulares cancerosas (**Figura 15A, 15B**), encontrando diferencias estadísticas ($p \leq 0,05$) entre células tratadas y no tratadas de la misma línea celular en MDA- MB-231 y HeLa; sin embargo, no presentaron citotoxicidad para la línea celular HSF1184 (**Figura 15C**). Los EC mostraron una ligera reducción en la viabilidad celular en la línea celular MCF-10A, 20% aproximadamente (**Figura 15D**), incluso en las dosis más altas. El comportamiento de extractos de ambas especies en las diferentes líneas celulares se observa adicionalmente con la determinación de CE_{50} (**Cuadro 11**).

Cuadro 11. CE_{50} de CE y OE de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* sobre líneas celulares de cáncer de mama, cervix y no tumorales

Extracto	Línea celular			
	CE_{50} $\mu\text{g/mL}$			
	HeLa	MDA-MB-231	HSF-1184	MCF-10A
PdCE	210.30 \pm 6.75 ^a	77.34 \pm 4.06 ^a	ND	ND
PdOE	201.5 \pm 8.29 ^a	37.49 \pm 0.95 ^c	ND	—
QsCE	184.03 \pm 7.83 ^b	46.83 \pm 0.73 ^b	ND	ND
QsOE	103.64 \pm 3.87 ^c	32.82 \pm 5.54 ^c	ND	—

ND: no detectado dentro del rango de concentración investigado. Los datos expresan la medias \pm SD de n = 6. Diferentes letras en cada columna son estadísticamente diferentes entre tratamientos. Prueba de Fisher-LSD $p \leq 0.05$.

Se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) en la determinación de la CE_{50} de CE y OE de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, sobre las líneas celulares empleadas. Se observó que los extractos orgánicos de ambas especies tienen un

importante efecto citotóxico sobre las células MDA-MB-231 y HeLa, específicamente EO de *Q. sideroxylla* quien obtuvo la menor CE₅₀ en ambas líneas celulares (103.64 ± 3.87; 32.82 ± 5.54, HeLa y MDA-MB-231 respectivamente).

8.5.3 Evaluación genotóxica

Los resultados del ensayo genotóxico de EC de las especies de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, se muestran en el **Cuadro 12**.

Cuadro 12. Evaluación genotóxica de extractos crudos de *P.durangensis* y *Q. sideroxylla* mediante el ensayo cometa

TRATAMIENTO	CLASE DE COMETA				
	TOTAL	0	1	2	3
Muestra de sangre a 4 H					
Control negativo	8±4.8	92.5±4.1	7±3.5	0.5±0.83	0±0
Control Positivo	67.3±10.5 ^a	66±4.2 ^a	11.8±3.6 ^a	11±3.6 ^a	11.1±2.0 ^a
QsEC100	16.8±6.3 ^{ab}	85.8±4.9 ^b	12.1±3.5 ^a	3.83±0.81 ^b	0.66±0.81 ^b
PdEC100	45.5±5.0 ^{ab}	64.1±3.7 ^a	36.8±3.7 ^{ab}	3.8±1.8 ^b	2.8±1.16 ^{ab}
QsEC200	39.5±6.2 ^{ab}	69.8±5.1 ^a	22.5±6.0 ^{ab}	6±2.1 ^{ab}	1.6±0.81 ^{ab}
PdEC200	52.5±7.1 ^{ab}	59.5±0.6 ^{ab}	32.3±2.9 ^{ab}	4.3±1.8 ^{ab}	3.8±1.9 ^{ab}
Muestra de sangre a 24 H					
Control negativo	18.5±6.9	88.6±3.1	7.6±3.3	3.1±2.4	1.5±1.0
Control Positivo	140.3±21.2 ^a	37.5±5.5 ^a	11±6.2 ^a	25.16±8.4 ^a	26.3±6.3 ^a
QsEC100	21.3±6.2 ^b	85.5±4.0 ^b	9.1±0.75 ^b	3.3±1.6 ^b	1.8±1.5 ^b
PdEC100	58.8±11.9 ^{ab}	53.3±6.7 ^{ab}	36.8±4.3 ^{ab}	7.5±2.3 ^b	2.3±2.2 ^b
QsEC200	60±14.4 ^{ab}	55.3±6.0 ^{ab}	33.3±3.4 ^{ab}	7.3±4.1 ^b	4±2.6 ^b
PdEC200	63.1±10.3 ^{ab}	49.5±7.1 ^{ab}	41±5.3 ^{ab}	6.33±1.2 ^b	3.1±1.7 ^b

Cada valor representa la media de $n = 6$ observaciones ± SD. a: diferencia significativa comparado con el control negativo, b: comparado con el control positivo; ($p < 0.05$) Dunnett, comparando los tratamientos por separado a las 4 y 24 horas.

De acuerdo a los resultados el control positivo (CPA 50 mg/kg) tiene los niveles más altos de daño según los cometas detectados, quienes fueron principalmente de clase 2 y 3, mientras que el control negativo presentó un predominio de la clase cero (**Figura 16**). En cuanto a la genotoxicidad de los EC de las especies, se encontró que QsCE100 después de 24 h generó daño similar al control negativo ($p \leq 0.05$). QsCE200 después de 4 y 24 h originó daño ligero con la formación de cometas clase 1, con el EC de *P. durangensis* se observaron resultados similares a las dosis evaluadas (100 y 200 mg/kg), además de encontrar un daño significativamente menor comparadas contra el control positivo ($p \leq 0.05$).

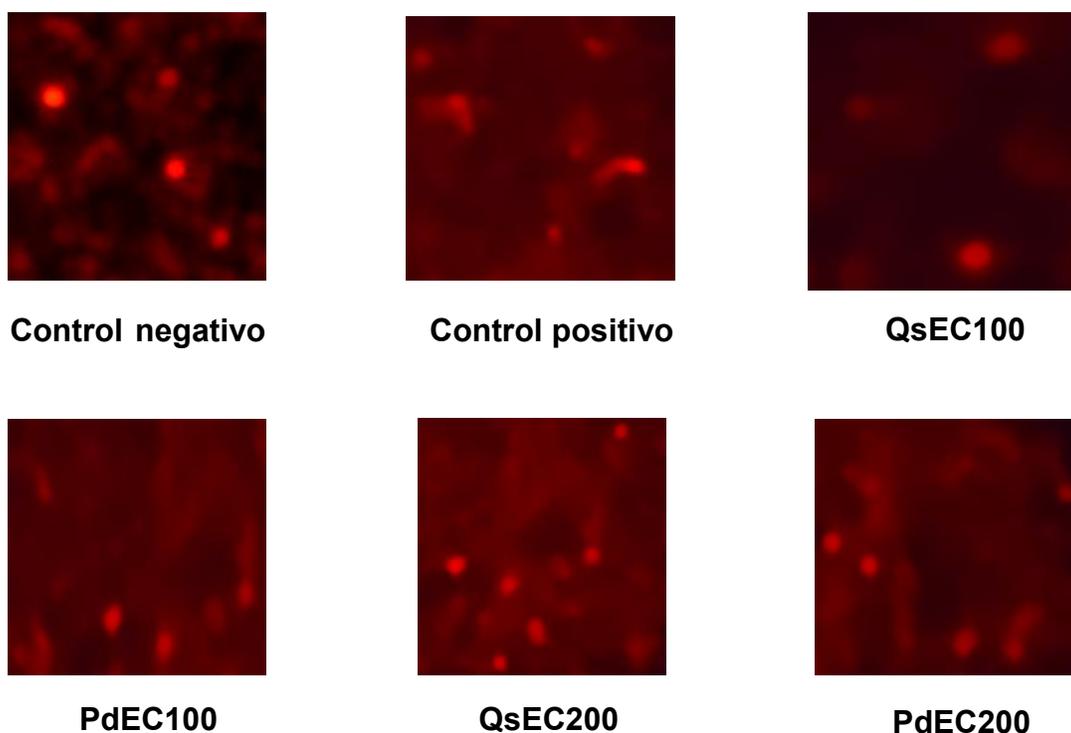


Figura 16. Imágenes del daño al DNA en células sanguíneas de ratón (400x) (ensayo cometa)

9. DISCUSIÓN

9.1 Obtención y evaluación de extractos de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*

9.1.1 Evaluación de extractos

En la evaluación del efecto del solvente y la relación masa: solvente (M: S) sobre la extracción de compuestos bioactivos de la corteza de las especies *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, se encontró que la concentración del solvente es el parámetro con mayor efecto en la extracción de metabolitos. Al respecto, estudios relacionados con extracción de fenoles con distintos solventes y métodos de extracción, mencionan que la extracción incrementa con el aumento del contenido del agua, lo que puede deberse a la facilidad de extracción por la solubilidad que presentan los compuestos de la muestra (Do *et al.* 2014). Respecto a la extracción de compuestos bioactivos en corteza de *Pinus radiata*, Ramos *et al.* (2013) obtuvieron mayor rendimiento del extracto al disminuir la concentración de etanol y utilizar temperatura de 40°C, caso contrario a lo observado para corteza de *P. durangensis*, en el que al disminuir la concentración de etanol se obtuvieron los menores rendimientos, esto tal vez sea debido al efecto de la temperatura empleada en este estudio, pues no fue la misma. Con respecto al efecto de la relación masa/volumen, Pinelo *et al.* (2005) encontraron óptimo trabajar con relaciones masa/solvente que involucren mayor volumen de solvente por considerarlo como un fenómeno adecuado de acuerdo a los principios de transferencia de masa. Spingo *et al.* (2007) y Nepote *et al.* (2005), encontraron mayores rendimientos de extracción con aquellas relaciones que involucran apenas un volumen de solvente necesario para cubrir el material de extracción. Se infiere que el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos de diversos materiales, depende principalmente de la naturaleza del compuesto extraíble –estructura, grado de polimerización- y su relación con la polaridad del solvente utilizado en la extracción, ya que no existe un método preciso para la extracción, (Bochi *et al.*, 2014; Sulaiman, 2011; Trabelsi *et al.*, 2010). Para la corteza de *Q. sideroxylla* se pueden obtener rendimientos del 21.6±1.4% con una baja concentración de etanol y el mínimo volumen de solvente (QsE20-1/10), que aunque no se obtiene el máximo rendimiento de

extracción en sólidos, podría ser conveniente considerando aspectos económicos al disminuir la concentración y el volumen de etanol.

Los compuestos fenólicos totales fueron determinados utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu, el cual reacciona con los fenoles para formar cromógenos, dando lugar a la formación del color azul lo que indica reducción; y permite su detección espectrofotométricamente.

De acuerdo al análisis sobre la concentración de compuestos fenólicos totales, se encontró que el solvente empleado es un factor significativo que modifica la concentración, esto se vio reflejado en los extractos de ambas especies, en donde la solución etanólica al 20% extrajo la menor cantidad de polifenoles. Ramos *et al.* (2013) reportaron una tendencia similar para extractos de corteza de *Pinus radiata*, ya que a mayor concentración de etanol, mayor fue la concentración de fenoles totales. Se encontró una diferencia significativa de la concentración de fenoles totales entre las dos especies de estudio ($p \leq 0.05$), lo cual revela que la concentración de estos compuestos en la corteza de *P. durangensis* es superior a la de *Q. sideroxylla*.

Los flavonoides constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal, por ello la mayoría de los extractos obtuvieron una cantidad menor de flavonoides que de compuestos fenólicos totales (polifenoles), independiente al efecto causado por el solvente y la relación M:S. De ambos parámetros evaluados, se observó efecto significativo principalmente por el solvente empleado en la extracción para ambas especies.

Los resultados mostrados en la **Figura 6** indican una presencia importante de FT dentro del perfil fenólico de las especies. Estos resultados concuerdan con los que reportan Rosales-Castro *et al.* (2009,2012) en extractos acetónicos de corteza de *P. cooperi*, *P. engelmannii* y *P. teocote*, así como los reportados para extractos acetónicos de *Q. sideroxylla*. Por otra parte, las proantocianidinas son un grupo particular de flavonoides y corresponden a compuestos de tipo flavan-3-ols (flavanoles o catequinas). A estos compuestos también se les conoce como taninos condensados.

La concentración de proantocianidinas en las dos especies de estudio fue similar, aun cuando fue *P. durangensis* quien obtuvo una mayor cantidad de flavonoides, lo que significa que esta especie contiene tanto flavonoides del tipo flavan-3-ol (catequinas), así como de otro tipo, mientras que *Q. sideroxylla* la concentración de flavonoides corresponden en su mayoría al tipo flavan-3-ol, lo cual coincide con lo reportado por Rosales-Castro *et al.* (2012); quien identificó dímeros y tetrámeros de proantocianidinas en la especie.

Es evidente que la extracción de compuestos fenólicos, flavonoides y PACS depende principalmente del solvente de extracción utilizado y de la especie, pues la obtención de estos metabolitos se modificó por la polaridad del solvente y la solubilidad de éstos en el disolvente utilizado para el proceso de extracción. Por lo tanto, es difícil que un solo solvente sea usado para la extracción óptima de todos los metabolitos de interés. Efectos similares en diferentes fuentes vegetales de extracción han reportado el uso de un solvente de polaridad mixta para extraer más contenido fenólico (Tan *et al.*, 2011; Kchaou *et al.*, 2013; Sulaiman *et al.*, 2011).

En cuanto a la actividad antioxidante de los extractos se observó la influencia de la relación M: S y del solvente. La mejor actividad antioxidante mediante DPPH se obtuvo con los extractos con etanol al 20% y 50%, así como la relación M:S de 1/30 y 1/10 para *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* (63.58 % \pm 3.7, 55.70 % \pm 2.4 respectivamente). Lo anterior coincide con lo reportado por Sulaiman *et al.*, (2011) quienes reportaron que la estimación cuantitativa de los valores de FT, FL, FRAP y DPPH está fuertemente influenciada por dos variables, el solvente de extracción y la especie de la planta. Otras investigaciones por parte de Sarikurkcu *et al.* (2009), reportaron una fuerte correlación entre la polaridad del solvente para la extracción de compuestos bioactivos (obtención de extractos) y su potencial antioxidante, indicando que los extractos más polares mostraron el mayor potencial para la neutralización de radicales libres. Aunque como se ha mencionado, el solvente facilitará la extracción de cierto tipo de compuestos dada su conformación química, lo cual se podría traducir en la exhibición de una mayor o menor actividad antioxidante por parte de los extractos.

En tanto, se encontró que los resultados de los ensayos de DPPH y FRAP en ambas especies fueron similares; sin embargo en ABTS la corteza de *Q. sideroxylla* mostró mayor actividad antioxidante, esto indica que aunque DPPH y ABTS se rigen por el mismo mecanismo de acción, ABTS muestra un porcentaje de atrapamiento de radicales libres mayor, lo cual podría deberse al hecho de que esta especie tiene una mayor concentración de compuestos polares que presentan una mejor solubilidad en el medio de ABTS. Al respecto, Manigandan *et al.* (2015), encontraron que la taxifolina tiene una menor inhibición por el ensayo de ABTS, comparada con el ensayo por DPPH, por lo que se puede inferir que *Q. sideroxylla* al contener mayor cantidad de compuestos de tipo flavan-3-ol (catequinas), y por ello muestre una actividad mayor en el ensayo de ABTS.

De manera general ambas especies mostraron su potencial antioxidante en todos los extractos obtenidos, lo que demuestra su capacidad en la donación o transferencia de electrones.

El análisis integral en la determinación de las mejores condiciones de extracción de EC, mostró que no se obtuvieron los parámetros óptimos que maximicen las variables de FT, FL, PACS, % de extracción y actividad antioxidante en conjunto, por ello se eligieron aquellas condiciones que lograron buenos resultados en actividad antioxidante y rendimiento, lo cual involucró la utilización de etanol al 50%, así como las relaciones M:S de 1/30 y 1/10 para *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* respectivamente.

9.1.2 Evaluación de EC y EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*

Con las condiciones de extracción obtenidas previamente, se logró la elaboración de los extractos crudos (EC) y extractos orgánicos (EO) de ambas especies de estudio. La evaluación del perfil fenólico se mostró en la **Figura 8**, en donde los extractos de las especies exhibieron altas concentraciones de FT, FL y PACS.

Se observó una mayor concentración de metabolitos por parte de los EO, adjudicado al solvente de extracción (acetato de etilo).

La cuantificación de PACS en *Q. sideroxylla* siguió la misma tendencia observada previamente en los extractos de análisis en parámetros de extracción, respecto a que

este tipo de metabolitos son los de mayor abundancia en la especie, incluso se observó un aumento considerable del metabolito en comparación al EC.

Los EC y el EO tuvieron una alta concentración de PACS en relación a su concentración de FT y FL, lo que significa la predominancia de este grupo de metabolitos dentro de los extractos obtenidos para la especie. Resultados similares en cuanto al efecto concentrador de los metabolitos en EC y EO han sido previamente reportados por Rosales *et al.*, (2012).

P. durangensis replica lo expuesto previamente en el análisis de las condiciones de extracción de EC, pues tiende a concentrar una gran cantidad de FT y FL, sin embargo la concentración de PACS es menor en comparación a los FT, incluso disminuyó en los EO de esta especie, refiriendo otro tipo de flavonoide.

9.2 Identificación de los principales polifenoles en los extractos para verificar la reproducibilidad de éstos en las especies

9.2.1 Identificación HPLC-UV

En los espectros HPLC-UV DAD de *P. durangensis* se encontraron señales de UV correspondientes a derivados de catequinas, catequina, un flavonoide de tipo dihidroflavonoide o flavanona, ya que presentaron absorbancia máxima en UV de 290 nm y un hombro a 335 nm, que son características para este tipo de flavonoides (Da Graça Campos & Markham, 2007), así como señales que corresponden a compuestos de tipo flavonol. Para los extractos de corteza de *P. radiata*, Ramos *et al.* (2013) reportaron que la especie contiene altas concentraciones de taxifolina (dihidroquercetina); Ku & Mun (2008) identificaron catequina, y taxifolina en la corteza de *Pinus radiata*, mientras que Rosales-Castro *et al.* (2009) reportaron la presencia de estos compuesto en las cortezas de *P. cooperi*, *P. engelmanni* y *P. teocote*, por lo cual la flavanona que contiene la corteza de *P. durangensis*, puede corresponder al flavonoide taxifolina. Uno de los flavonoles pudiera corresponder a quercetina, ya que se ha reportado en *P. radiata*. En *Q. sideroxylla* el compuesto a 4.5 min puede corresponder a ácido gálico, los de 5.4 y 6.5 min, con absorbancias a 278 nm son compuestos de tipo flavan-3-ol, el de 8.9 min corresponde a catequina y por las señales

de UV que presentan los compuestos a 19.7 y 22.2 min., corresponden a flavonoles. Para esta especie Rosales-Castro *et al.* (2012) reportó la presencia de ácido gálico, catequina y otros flavan-3-ols.

9.2.2 Identificación HPLC- ESI-MS

La caracterización de extractos OE de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* se obtuvo con el análisis de los picos principales de extractos orgánicos de la corteza del pino (**Cuadro 4**), donde los compuestos de los picos 11, 12, 15, 16, 25, 36, 40, 41 y 58 coinciden con compuestos recientemente reportados por Rosales (2017) para corteza de *P. durangensis*, demostrando la presencia de flavonoides como procianidinas y taxifolina. También se encontraron otros constituyentes en el cromatograma de iones totales cuya información obtenida se comparó con la literatura pertinente con el fin de obtener una identificación provisional (en su mayoría estudios sobre compuestos de corteza de *Pinus* y *Quercus*), encontrándose: kaempferol y eriodictimol ([MH] - 285 y 287 respectivamente; De la Luz Cádiz Gurrea *et al.*, 2014), taxifolina - o - hexosido ([MH] - 465, Cretu *et al.*, 2013), β - hidroxipropiovanilona glucósido ([MH] - 357, Karonen *et al.*, 2004), HHDP - Galoyl-glucosa ([MH] - 357, Fernández *et al.*, 2009), glicol de trigaloilo ([MH] - 635, Mucilli *et al.*, 2017), galato de (Epi) catequina - 3 - O - glucósido] - 603, Jiménez-Sánchez *et al.*, 2015), ácido t-caftárico ([MH] - 311, Pardo-García *et al.*, 2014).

El perfil polifenólico de *Q. sideroxylla* se mostró en el **Cuadro 5**. Los compuestos de catequina / epicatequina y dímeros de procianidina (picos 6, 10, 12 y 13) fueron por mucho los polifenoles dominantes en el extracto de corteza de esta especie, lo cual coincide con lo reportado por Rosales *et al.* (2012). Otros compuestos presentes en el extracto se compararon también con la literatura previamente descrita, logrando la identificación tentativa de constituyentes como Quercetina 3-O-glucósido y ácido t-caftárico ([MH] - 463 y 311 respectivamente, Pardo-García *et al.*, 2014), el ácido elágico - rhamnosido ([MH] -447: Santos *et al.*, 2013) hexanos de ácido gálico ([MH] - 331, Lorenz *et al.*, 2016) taxifolina ([MH] - 303; Rosales *et.*, 2017). Incluyendo otros compuestos desconocidos reportados en corteza, que fueron detectados en ambos extractos ([M-H] - 293; Ma'mmela *et al.*, 2000).

Con la información obtenida del HPLC-ESI-MS para la identificación fenólica en las especies de estudio, se pudo elucidar con mayor precisión la presencia de los metabolitos presentes en sus extractos, de modo que quedó demostrada la reproducibilidad de compuestos fenólicos en la corteza de las especies *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*.

9.3 Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos con métodos *in vitro* y mediante el método de lipoperoxidación hepática *in vivo*

Las técnicas *in vitro* de ABTS, DPPH y FRAP, miden la habilidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, el cual cambia de color cuando es reducido y se basan en la capacidad de transferencia de electrones.

Se ha descrito que los compuestos fenólicos, específicamente flavonoides tienen la propiedad de actuar como antioxidantes. Lo anterior se explica por el hecho de que en su estructura química contienen múltiples sustituciones de OH, lo que los hace poseer una potente actividad antioxidante contra los radicales libres.

Los EO de ambas especies mostraron una mayor actividad en comparación a sus EC y estándares de referencia (catequina y taxifolina).

Los ensayos de actividad antioxidante revelaron que los extractos tienen una alta actividad, lo cual corresponde a lo obtenido en los estudios previos de los extractos de ambas especies. La evaluación de los EC y EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* mostraron una mayor actividad antioxidante en la técnica de ABTS, esto corresponde a lo observado anteriormente en los extractos durante el análisis de condiciones de extracción. Los resultados de la actividad antioxidante mostraron que los extractos son capaces de estabilizar radicales DPPH o ABTS o bien, que pueden actuar como agentes reductores de metal (como se indica por la reacción FRAP).

El hecho de que se incremente la capacidad antioxidante es un indicio de la adecuada extracción y concentración de metabolitos de FT, FL y PACS, los cuales se han correlacionado directamente con la actividad antioxidante (Kumar *et al.*, 2017).

Efectos similares fueron encontrados por Rosales *et al.*, (2003) quienes proponen que los compuestos presentes, pudieran ser los responsables de dicha actividad, así como también de la variación encontrada entre EC y EO. Este efecto puede asociarse a las

características particulares de las estructuras fenólicas, tales como mayor o menor cantidad de grupos hidroxilo en la molécula, tipo de sustitución y posición en el anillo bencénico y/o formas monoméricas o polimerizadas, lo cual está estrechamente relacionado con las actividades antirradicales libres.

La utilización de estudios de actividad antioxidante *in vivo*, permite evaluar de una manera más integral la acción de un metabolito, puesto que involucran el efecto de la exposición a procesos biológicos y fisiológicos que tienen lugar en el organismo.

El ensayo de lipoperoxidación es uno de los más empleados, ya que evalúa la incidencia de la actividad antioxidante a través de la oxidación de los lípidos formadores de la membrana celular, lo que se correlaciona con el estado oxidativo de la célula *in vivo*. La evaluación de la oxidación de lípidos de la membrana celular se realiza con la técnica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico el cual da como producto el MDA, que es un producto final en el proceso de oxidación de lípidos, como consecuencia de la degeneración de los radicales libres de oxígeno (Alam *et al.*, 2013). La evaluación antioxidante *in vivo* se encuentra en el **Cuadro 7**. Los resultados mostraron actividad antioxidante al disminuir las concentraciones de biomarcador MDA en el modelo murino de hiperglucemia. QsEO50 obtuvo la mayor actividad antioxidante en hígado (7.46 ± 1.05) y manifiesta diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a los controles negativo y positivo. Estos resultados son importantes puesto que en la diabetes, el aumento del estado oxidativo desempeña un factor clave en la progresión al daño del páncreas y tejidos extrapancreáticos. (Huang *et al.*, 2015; Ayala *et al.*, 2014). Por lo tanto, una disminución en la peroxidación de ácidos grasos y la mejora en el estado antioxidante podrían contribuir a la prevención de las complicaciones diabéticas.

La concentración de MDA en hígados de ratas hipercolesterolemiantes sin tratamiento (extractos) fue elevada, lo cual sugiere que la hipercolesterolemia puede aumentar el proceso de peroxidación lipídica desencadenada por más especies reactivas de oxígeno (Ayala *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos de la actividad antioxidante en el modelo hipercolesterolémico, mostraron efecto antioxidante por parte de los extractos de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, siendo mayor en todos los EO. Estos resultados coinciden con los obtenidos *in vitro* puesto que los EO de ambas especies manifiestan un mayor efecto antioxidante en comparación a sus EC.

Se ha reportado que la inhibición en la concentración de MDA puede ser el resultado de la actividad antioxidante de los flavonoides que actúan neutralizando los radicales libres, además de intervenir como estimuladores del sistema antioxidante endógeno (SOD, CAT; (Keshari *et al.*, 2016)).

9.4 Evaluación del efecto hipoglucemiante e hipocolesterolemia en murino; y la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa *in vitro*

9.4.1 Evaluación de la Inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa *in vitro*

Se demostró la actividad inhibitoria de CE y EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* sobre las enzimas hidrolizantes de carbohidratos, α -amilasa y α -glucosidasa. Los comportamientos observados fueron dosis-dependiente en el efecto inhibitorio por parte de los EC y EO de ambas especies, sobre cada enzima. De estos resultados se pudo determinar el valor de CE_{50} referido a cada extracto, con un mayor efecto inhibitorio por parte de los EO de las especies en comparación de los EC, e incluso de la acarbosa, que es un oligosacárido empleado en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Los EO de *P. durangensis* fueron los mejores inhibidores enzimáticos de α -amilasa y α -glucosidasa *in vitro* en comparación a *Q. sideroxylla*. El comportamiento expresado por EO podría ser por una mayor concentración de metabolitos y una mayor selectividad de éstos, con propiedades biológicas más activas.

Resultados similares fueron reportados por Schäfer *et al.* (2007) quienes reportaron que extractos de corteza del *Pinus marítima* (pycnogenol) tuvieron mayor efecto inhibitorio sobre la enzima α -glucosidasa, con una fracción que contenía procianidinas oligoméricas, en comparación a una fracción con procianidinas monoméricas, lo que puede indicar que la actividad biológica obtenida de los extractos, está relacionada

directamente con el tipo de metabolitos presente en el mismo. La actividad inhibitoria de *P. durangensis* pudiera asociarse a los compuestos presentes en su EO.

De manera general, los resultados del efecto inhibitorio enzimático obtenidos de los dos ensayos, podría ser por un efecto sinérgico de los compuestos fenólicos presentes en los extractos, puesto que la actividad inhibitoria de la acarbosa sobre la enzima fue menor. Por otra parte, se ha reportado que los antioxidantes poseen una alta capacidad para contribuir a la prevención de la diabetes tipo 2 a través de sus propiedades anti-inflamatorias (Umeno *et al.*, 2016). Por lo tanto, los mecanismos, del efecto antioxidante así como la inhibición de la α -amilasa y α -glucosidasa podrían conjuntarse para producir un efecto antihiper glucemiante. Además, la inhibición de la captación de glucosa en el intestino puede ayudar a controlar sus niveles en sangre, mediante la regulación de la α -amilasa producto de la secreción del páncreas y de las glándulas salivales, que juegan un papel importante en la digestión, participando en la absorción intestinal. Por ello se cree que la inhibición de estas enzimas pueden reducir significativamente el aumento postprandial en el nivel de glucosa en sangre, lo que es importante en el tratamiento de la diabetes (Giordani *et al.*, 2015; Lordan *et al.*, 2013).

9.4.2 Evaluación de la actividad y efecto hipoglucemiante

De acuerdo a los resultado de este estudio, los extractos QsEC50 y EO de ambas especies evitaron el incremento de la glucemia en los animales empleados en las curvas de tolerancia a la glucosa en ratas normoglicémicas, además, ambas especies tuvieron un AUC menor al obtenido por el grupo control, lo que indica que poseen la mayor actividad hipoglucemiante; y en el caso de los EO con un comportamiento similar.

En este estudio se pudo observar la actividad hipoglucémica de QsEC50, QsEO50 y PdEO50 en ratas diabéticas con respecto al grupo diabético, además se observó que los OE pueden eliminar los picos hiperglucémicos y de esta manera mantener los niveles de glucosa a niveles más estables, lo cual se observó en su comportamiento desde la curva de tolerancia a la glucosa. A pesar del hecho de que EC y EO mostraron un efecto hipoglucémico al inicio del tratamiento, éste se perdió en el caso de QsEC50

conforme avanzó el tratamiento (**Cuadro 9**). El modelo de inducción de diabetes con estreptozotocina semeja a la diabetes tipo 1 ya que el antibiótico produce destrucción de las células beta del páncreas productoras de insulina por lo tanto los animales carecen de la hormona, un tratamiento hipoglucémico en este caso con los EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* podrían ser coadyuvantes en el tratamiento de la diabetes tipo 1, sin embargo no sustituyen la terapia con insulina.

Se considera también la posibilidad de que la inhibición de la actividad α -amilasa por parte de los compuestos fenólicos y el efecto antioxidante por compuestos como la catequina sean mecanismos asociados con las propiedades farmacológicas de compuestos bioactivos de corteza de las especies de estudio.

El mayor efecto hipoglucémico mostrado por los EO de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* podría explicarse por la mayor concentración de fenoles en comparación con los EC; sin embargo es necesario hacer más experimentos para demostrar que EC y EO inhiben la absorción de carbohidratos en el intestino.

Varios estudios han demostrado que la administración de extractos de plantas que contienen fenoles, disminuyen los niveles de glucosa por la presencia de flavonoides como la quercetina y la catequina, los cuales promueven un almacenamiento importante de glucógeno hepático (Alam *et al.*, 2014; Vasconcelos *et al.*, 2011). Otros mecanismos posibles implican la actividad de las procianidinas al inhibir la actividad de las enzimas hidrolizadoras de carbohidratos (lo cual sucedió con los ensayos *in vitro* de α -amilasa y α -glucosidasa), la epicatequina al inducir la regeneración de las células β pancreáticas; y la catequina y los ácidos fenólicos que inhiben la absorción intestinal de glucosa mediada por GLUT2 y SGLT1 (Parveen *et al.*, 2010; Manzano *et al.*, 2010).

Se ha reportado el efecto de polifenoles como la quercetina, resveratrol y catequinas como moduladores de mecanismos dependientes de AMPK-SIRT1PPAR γ , con función importante como antiinflamatorio, antiobesidad, antiesteatosis e hipoglucémico, efectos de la acción sinérgica de varios metabolitos tipo polifenoles (Herrera-Calderón *et al.*, 2015). Por ello se considera que los extractos de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*

pueden actuar como coadyuvantes en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 principalmente, al mostrar efectos benéficos en la hiperglucemia postprandial; además de su actividad antioxidante *in vivo*.

9.4.3. Evaluación del efecto hipocolesterolemizante

El tiloxapol es un ensayo muy empleado para inducir hiperlipidemia aguda en animales de experimentación y así poder evaluar el efecto hipolipidémico de fármacos. En este caso se utilizó el tiloxapol como modelo de inducción a la hipercolesterolemia, obteniendo un patrón similar a otras investigaciones en el cambio del perfil lipídico a las 24 h después de la inyección de tiloxapol. (Sikarwar & Patil (2015).

Se ha reportado que en este tipo de modelos se provoca un aumento drástico en la concentración de TGC y CT debido al aumento de colesterol hepático, ejercido principalmente por el incremento de HMG Co-3- metil-glutaril Co-A y por la inhibición de la lipoproteína lipasa, responsable de la hidrólisis de lípidos en plasma. Debido a esto, la inhibición significativa de los niveles de lípidos mediante extractos, es indicativa de la inhibición de la biosíntesis del colesterol por inhibición de HMG Co-A (Mandukhail *et al.*, 2010). En este estudio los EO y EC de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* no modificaron significativamente el perfil lipídico, se puede decir que no están realizando un efecto sobre estos mecanismos, y no poseen actividad hipolipemizante.

Ramchoun *et al.* (2009), evaluaron el efecto hipocolesterolemizante de extractos de tomillo y lavanda, en donde encontraron que ambos extractos tenían una gran concentración de polifenoles totales con una gran capacidad antioxidante, pero no ejercieron ningún efecto hipocolesterolemizante, por lo que relacionan los efectos obtenidos con la estructura química de los polifenoles en cada extracto.

Se ha observado que la estructura está íntimamente relacionada con la actividad de los compuestos fenólicos, lo que hace pensar que tal vez los EC de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, poseen en su contenido fenólico compuestos cuya estructura permite una potente actividad antioxidante, pero al mismo tiempo son más susceptibles a mostrarse como agentes prooxidantes, (lo que neutraliza los referidos efectos

antioxidantes), causando resultados adversos, como pudiera ser el incremento de colesterol total. Respecto a ello Pérez (2003), hace alusión a este fenómeno, al reportar que compuestos como las antocianidinas, las cuales tienen buenas propiedades secuestrantes de radicales libres pero, dependiendo de las condiciones experimentales, sus bajos potenciales de oxidación pueden hacer que éstas se comporten también como agentes prooxidantes involucrándose en procesos de ciclaje redox. Se ha encontrado que los flavonoides con un grupo pirogalólico en el anillo B exhiben una mayor actividad antioxidante con pero con mayor susceptibilidad a actuar como pro oxidante.

Esto se relaciona también con lo reportado con algunos investigadores que indican la eficacia de los polifenoles y flavonoides como antioxidantes no sólo atribuida por su composición o su cantidad relativa, sino también por el grado de polimerización, concentración e interacción de sus diversas estructuras químicas con los ensayos colorimétricos. Por lo tanto, los niveles más altos de FT y FL no necesariamente corresponden a las mejores respuestas antioxidantes (Kumar & Pandey, 2013).

9.5 Evaluación toxicológica

9.5.1 Determinación de DL₅₀

La evaluación de la acción tóxica de los extractos de plantas es indispensable para considerar un tratamiento seguro; permite la definición de la toxicidad intrínseca de la planta y los efectos de una sobredosis aguda. El empleo de ratones de laboratorio se fundamenta en su sensibilidad a las sustancias tóxicas que se producen en las plantas (Parra *et al.*, 2001).

La administración de los extractos en cantidades crecientes permitió la evaluación de los límites de toxicidad (DL₅₀) en los EC de *P. durangensis* y *Q. sideroxyla*.

La DL₅₀ de ambas especies fue de 5000 mg/kg, la cual es una dosis alta en comparación a otras encontradas en extractos de corteza. Autores como Márquez *et al.*, (2008), determinaron una DL₅₀ de 4000mg/kg en extractos de la especie *Pinus leiophylla*, de mismo modo Rohdewald (2005) hace un análisis de diversos estudios de toxicidad en *Pinus marítima*, en el cual reporta una DL₅₀ de entre 1000-4000 mg/kg. Jaiswal (2009) reporta la DL₅₀ de 3000 mg/kg para *Moringa oleífera lam*, y Tanko *et*

al., (2008) determina una DL_{50} de 1264.9 mg/kg mostrando efectos tóxicos como disminución de la actividad locomotora, lo que demuestra la importancia de la evaluación de dicho parámetro.

Los resultados del presente estudio demostraron que la DL_{50} es considerada de seguridad tóxica hasta 5000 mg/kg al no presentar mortalidad ni efectos tóxicos.

9.5.2 Evaluación citotóxica

Los EC y EO de ambas especies redujeron la viabilidad celular de las líneas celulares cancerosas MDA-MB-231 y HeLa de una manera dependiente de la concentración (**Figura 15 (a), (b)**). Los resultados obtenidos en la línea celular HSF1184 indicaron que los EC y EO de ambas especies no fueron citotóxicos puesto que no se disminuyó significativamente la viabilidad celular; sin embargo los extractos crudos mostraron una ligera reducción en la viabilidad celular de las células MCF-10A, pero el comportamiento fue constante incluso a la dosis más alta aplicada. Estos resultados indican que los extractos de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* presentan selectividad, pues redujeron la viabilidad celular de las células tumorales sin afectar significativamente las líneas celulares no tumorales.

Varias investigaciones indican que los efectos obtenidos sobre la proliferación celular están relacionados con la dosis y el tipo celular, lo que implica una sensibilidad diferente a diversas líneas celulares (Anlar *et al.*, 2016; Gezer *et al.*, 2015). También se ha informado de que la actividad selectiva de los compuestos citotóxicos frente a las células sanas (MCF-10A) y tumorales se debe a un amplio espectro de mecanismos que pueden ser responsables de la resistencia, y estos incluyen diferencias en la localización subcelular de Bik, y diferencias en la función mitocondrial (Studzinska-Sroka *et al.*, 2016). Ello puede explicar la sensibilidad ejercida por los extractos de corteza de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* en las líneas celulares.

El comportamiento de los EC y EO de ambas especies en las diferentes líneas celulares se observó adicionalmente con la determinación de CE_{50} , donde se muestra que los EO de ambas especies tienen un mayor efecto citotóxico sobre células de la línea MDA-MB-231 y HeLa, en comparación a los EC, lo cual supone que los

compuestos presentes en cada uno de los extractos desempeñan un papel fundamental para la actividad citotóxica de los mismos. Se ha reportado que compuestos como la taxifolina y las procianidinas poseen efecto citotóxico al inhibir la proliferación de células de cáncer cervical (HeLa), e intervenir en la regulación de la expresión de proteínas apoptóticas p53 y p21 (Amalinei *et al.*, 2014). Lo anterior podría explicar el efecto de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, ya que es la taxifolina y las procianidinas quienes forman parte de sus componentes más abundantes. También se ha demostrado que los flavonoides que poseen un enlace insaturado C2 - C3 y un grupo carbonilo en la posición 4 exhiben CE₅₀ más baja, debido a que estos dos grupos funcionales pueden aumentar la actividad de compuestos flavonoides, al proporcionar la estabilidad de radicales mediante conjugación y deslocalización electrónica (Sadeghi-Aliabadi *et al.*, 2012).

No existe evidencia del efecto citotóxico por parte de las especies *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, sin embargo varias investigaciones informan efectos citotóxicos de algunas especies de pinus y encino sobre diferentes líneas celulares, en donde se relaciona la presencia de sus compuestos con su actividad citotóxica (Sarmeili *et al.*, 2017, Amessis-Ouchemoukh *et al.*, 2017, Li *et al.*, 2016, Moradi *et al.*, 2016, Şöhretoğlu *et al.*, 2012).

Debido a los resultados obtenidos en este ensayo en donde se obtuvo un importante efecto citotóxico sobre las líneas celulares MDA-MB-231 y HeLa, y tienen poco o nulo efecto en la viabilidad celular sobre HSF-1184 y MCF-10 es necesario realizar estudios adicionales para comprender el posible mecanismo de acción y su potencial uso como agente anticancerígeno.

9.5.3 Evaluación genotóxica

En este ensayo se mostró el efecto sobre daño al ADN de células de sangre periférica de ratón al ser expuestas a dosis de los EC de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*.

Los resultados del ensayo cometa para EC de *P. durangensis* indicaron ligera genotoxicidad al generar cometas tipo 1 en ambas dosis evaluadas (100 y 200 mg/kg peso corporal) realizadas a las 4 y 24 h. Se encontró que la especie de *Q. sideroxylla*

a su dosis más baja (100 mg/kg peso corporal) no posee efectos genotóxicos, al predominar cometas tipo 0 en las evaluaciones y a los tiempos establecidos, en tanto a 200 mg/kg peso corporal generó una ligera genotoxicidad al inducir la presencia de cometas tipo 1 principalmente. Algunos estudios han mostrado efectos genotóxicos a relación dosis-dependiente e incluso refieren la posible activación de diferentes vías celulares dependiendo de la dosis probada (Almonte-Flores *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2014).

La ligera genotoxicidad de *P. duragensis* podría deberse a algunos de sus componentes, pues existe evidencia de que compuestos como la quercetina y naringenina pueden ser altamente citotóxicos y capaces de inducir daño en el ADN, debido a acciones prooxidantes, sin embargo también refieren que ese mismo efecto podrían ser un mecanismo importante de sus propiedades anticancerígenas *in vivo* (George *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que los flavonoides tienen efectos contra el daño del ADN inducido por diversos agente genotóxicos, es decir, principalmente por la capacidad de protección contra los ROS producidos y por la modulación de enzimas responsables de la bioactivación y detoxificación de los agentes genotóxicos, además de una relación entre la estructura y la actividad de los flavonoides en la protección del material genético (Luca *et al.*, 2016).

10. CONCLUSIONES

- Las cortezas de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* contienen altas concentraciones de fenoles con capacidad antioxidante. Las soluciones hidroetanólicas al 20, 50 y 80% v/v son eficientes para la extracción de fenoles, considerando que lo recomendable es la utilización de disolventes considerados de baja toxicidad.
- La concentración de etanol y la relación masa/volumen de solvente utilizado tienen un efecto significativo en la extracción de fenoles, ya que se obtienen diferentes rendimientos, cantidad de fenoles y capacidad antioxidante en los extractos preliminares obtenidos con los distintos tratamientos aplicados.
- La concentración de etanol tuvo mayor efecto que la relación masa/volumen de extracción. *P. durangensis* contiene mayor concentración de fenoles y de flavonoides, respecto a *Q. sideroxylla*, mientras que la cantidad de proantocianidinas es similar en ambas especies.
- No se encontró un tratamiento único para maximizar todas las variables respuesta. Considerando que las cortezas de ambas especies son subproductos importantes y viables para ser utilizados como nutracéuticos, desde el punto de vista económico es conveniente seleccionar el tratamiento que requiera el menor gasto de disolvente, ya sea baja concentración de etanol y/o bajo volumen de extracción.
- Los extractos crudos y orgánicos de las especies de estudio mostraron alta actividad antioxidante *in vitro* en comparación al estándar empleado, incluso incrementada en extractos orgánicos.
- En la evaluación antioxidante *in vivo*, los extractos crudos y orgánicos de *Q. sideroxylla* tuvieron efecto sobre los niveles de lipoperoxidación hepática en ambos modelos murinos,
- *Q. sideroxylla* y *P. durangensis* mostraron actividad y efecto hipoglucemiante mediante los ensayos *in vitro* de la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa; y en la evaluación hipoglucemiante en modelo murino de diabetes inducida.

- Los extractos orgánicos de la corteza de ambas especies de estudio, mostraron un mayor efecto sobre el modelo de hipercolesterolemia, en comparación con el extracto crudo.
- Se encontró que la dosis letal media de ambos extractos fue ≥ 5000 mg/kg sin manifestación de signos tóxicos.
- Se encontró efecto quimio protector con selectividad citotóxica de los extractos crudos y orgánicos de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*, de manera dosis-dependiente frente a células de cáncer y no tumorales de las líneas celulares HeLa, MDA-MB-231, HSF-1184 y MCF-10A.
- El ensayo cometa, reveló bajos niveles de genotoxicidad en células sanguíneas de ratón. en los extractos crudos de ambas especies (a las 4 y 24 h), mediante la formación de cometas clase 1 principalmente.
- Se encontró reproducibilidad de metabolitos en los extractos crudo y orgánico de las especies *Q. sideroxylla* y *P. durangensis*, analizados por HPLC-UV-DAD y HPLC-ESI-MS. Se Logró la identificación de flavonoides principalmente de tipo flavanona y flavonol como taxifolina y quercetina para *P. durangensis*, mientras que *Q. sideroxylla* contiene ácido gálico y flavan-3-ol (catequinas).

Todos los resultados derivados de este trabajo de investigación dan la base para el futuro empleo de los extractos orgánicos obtenidos de la corteza de *Q. sideroxylla*, puesto que es la especie que presenta el mejor comportamiento como nutracéutico.

11. RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta los resultados de actividad citotóxica de la especie *Q. sideroxylla* sobre líneas de cáncer, es indispensable estudiar los posibles mecanismos de acción de dicho efecto citotóxico así como de la selectividad celular observada, a fin de clarificar o proponer una ruta presumible de acción. Asimismo, es importante estudiar el posible efecto antígenotóxico a fin de evaluar su potencial preventivo en la defensa frente a agresiones oxidativas en ADN.

También se propone el estudio del posible efecto de los extractos sobre un modelo murino con inducción tumoral.

De igual forma es importante seguir estudiando nuevos indicadores de bioactividad sobre patologías asociadas al estrés oxidativo, para extractos de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla*.

12. REFERENCIAS

- **Adeneye, A. A., & Crooks, P. A. (2015).** Weight losing, antihyperlipidemic and cardioprotective effects of the alkaloid fraction of *Hunteria umbellata* seed extract on normal and triton-induced hyperlipidemic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(5), 387-394.
- **Adeneye, A. A., Adeyemi, O. O., & Agbaje, E. O. (2010).** Anti-obesity and antihyperlipidaemic effect of *Hunteria umbellata* seed extract in experimental hyperlipidaemia. *Journal of ethnopharmacology*, 130(2), 307-314.
- **Aguilar-López, J., Jaén-Jiménez, J. C., Vargas-Abarca, A. S., Jiménez-Bonilla, P., Vega-Guzmán, I., Herrera-Núñez, J., & Soto-Fallas, R. M. (2012).** Extracción y evaluación de taninos condensados a partir de la corteza de once especies maderables de Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 25(4), 15-22.
- **Alam, F., Islam, M. A., Kamal, M. A., & Gan, S. H. (2016).** Updates on managing type 2 diabetes mellitus with natural products: towards antidiabetic drug development. *Current Medicinal Chemistry*, 23, 1-37.
- **Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013).** Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- **Almonte-Flores, D. C., Paniagua-Castro, N., Escalona-Cardoso, G., & Rosales-Castro, M. (2015).** Pharmacological and genotoxic properties of polyphenolic extracts of *Cedrela odorata* L. and *Juglans regia* L. barks in rodents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- **Alves, A. B. C. R., dos Santos, R. S. de Santana Calil S (2014).** Genotoxic assessment of *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract *in vivo* and its potential chemoprevention against cyclophosphamide-induced DNA damage. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 153, no. 3, pp. 694–700, 2014.
- **Amalinei, R. L., Trifan, A., Cioanca, O., Miron, S. D., Mihai, C. T., Rotinberg, P., & Miron, A. (2014).** Polyphenol-rich extract from *Pinus sylvestris* L. bark-chemical and antitumor studies. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 118, 551-557.
- **Amararathna, M., Johnston, M. R., & Rupasinghe, H. P. (2016).** Plant polyphenols as chemopreventive agents for lung cancer. *International journal of molecular sciences*, 17(8), 1352.
- **American Diabetes Association. (2014).** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 37(Supplement 1), S81-S90.
- **Amessis-Ouchemoukh, N., Ouchemoukh, S., Meziat, N., Idiri, Y., Hernanz, D., Stinco, C. M., Luis, J. (2017).** Bioactive metabolites involved in the antioxidant, anticancer and anticalpain activities of *Ficus carica* L., *Ceratonia siliqua* L. and *Quercus ilex* L. extracts. *Ind. Crops Prod.*95, 6-17.
- **Anlar, H. G., Bacanlı, M., Kutluk, B., Ahmet, A., & Başaran, N. B. (2016).** Cytotoxic Activity of Resveratrol in Different Cell Lines Evaluated by MTT and NRU Assays. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1).

- **Arencibia, D. F., Rosario, L. A., & Curveco, D. L. (2003).** Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de Toxicología*, 40-52.
- **Arizaga, S. (2009).** *Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos*. Instituto Nacional de Ecología. 1 Ed. ISBN: 978-968-817-Impreso en México.
- **Ayala, M. F. Muñoz, and S. Arguelles (2014).** Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2014, Article ID 360438, 31 pages.
- **Bahadoran, Z., Mirmiran, P., & Azizi, F. (2013).** Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 12(1), 43.
- **Bermejo, B., Pontones, J. B. (1999).** Los pinos mexicanos y su utilización como especies introducidas de alto potencial en varios países del mundo. *Segundo Simposio sobre Avances en la Producción de Semillas Forestales en América Latina*. CATIE. Santo Domingo, República Dominicana.
- **Bernal, J., Mendiola, J. A., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2011).** Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 55(4), 758-774.
- **Bochi, V.C.; Barcia, M. T.; Rodrigues, D.; Speroni, C.S.; Giusti, M.M.; Godoy, H. T. (2014).** Polyphenol extraction optimisation from Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. *Food Chemistry* 164:347-354.
- **Brand- Williams, W., M.E Cuvelier and C. Berset, (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Tehnol.*, 28,25-30
- **Chauhan, B., Kumar, G., Kalam, N., & Ansari, S. H. (2013).** Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: a review. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 4(1), 4.
- **Chavarria, D., Silva, T., Martins, D., Bravo, J., Summavielle, T., Garrido, J., & Borges, F. (2015).** Exploring cinnamic acid scaffold: development of promising neuroprotective lipophilic antioxidants. *MedChemComm*, 6(6), 1043-1053.
- **Chuang, C. C., & McIntosh, M. K. (2011).** Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Annual review of nutrition*, 31, 155-176.
- **Cretu, E., Karonen, M., Salminen, J. P., Mircea, C., Trifan, A., Charalambous, C. Miron, A. (2013).** In vitro study on the antioxidant activity of a polyphenol-rich extract from *Pinus brutia* bark and its fractions. *J Med Food*, 16, 984-991.
- **Cruz-Contreras, C. (2012).** Tesis: Residuos generados del aprovechamiento maderable en el estado de Durango. Universidad Autónoma Chapingo.
- **D. Huang, Y. Jiang, W. Chen, F. Yao, G. Huang, and L. Sun. (2015).** Evaluation of hypoglycemic effects of polyphenols and extracts from *Penthorum chinense*. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 163, pp. 256–263.

- **Lorke, D. (1983).** “A new approach to practical acute toxicity testing,” *Archives of Toxicology*. vol. 54, no. 4, pp. 275–287.
- **Da Graça Campos, M.; Markham, K.R. 2007.** Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: flavones, flavonols and phenolic acids. *Imprensa da Univ. de Coimbra*.
- **De la Luz Cádiz-Gurrea, M., Fernández-Arroyo, S., & Segura-Carretero, A. (2014).** Pine bark and green tea concentrated extracts: antioxidant activity and comprehensive characterization of bioactive compounds by HPLC–ESI-QTOF-MS. *International journal of molecular sciences*, 15(11), 20382-20402.
- **DeFelice, S. L. (1995).** The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends in Food Science & Technology*, 6(2), 59-61.
- **Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013).** Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 18(14), 1818-1892.
- **Do, Q. D.; Angkawijaya, A. E.; Tran-Nguyen, P. L.; Huynh, L.H.; Soetaredjo, F. E.; Ismadji, S.; Ju, Y.H. 2014.** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *Journal of Food and Drug Analysis* 22(3):296-302.
- **Dragan, S., Andrica, F., Serban, M. C., & Timar, R. (2015).** Polyphenols-rich natural products for treatment of diabetes. *Current medicinal chemistry*, 22(1), 14-22.
- **Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., & Lamas, S. (2015).** Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox biology*, 6, 183-197.
- **Fatani, S. H., Babakr, A. T., NourEldin, E. M., & Almarzouki, A. A. (2016).** Lipid peroxidation is associated with poor control of type-2 diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 10(2), S64-S67.
- **Fernandes, A., Fernandes, I., Cruz, L., Mateus, N., Cabral, M., de Freitas, V. (2009).** Antioxidant and biological properties of bioactive phenolic compounds from *Quercus suber* L. *J. Agric. Food. Chem.* 57, 11154-11160
- **Ferreira, M. A., Silva, D. M., Morais, A. C., Mota, J. F., & Botelho, P. B. (2016).** Therapeutic potential of green tea on risk factors for type 2 diabetes in obese adults—a review. *Obesity Reviews*, 17(12), 1316-1328.
- **Formica, J. V., & Regelson, W. (1995).** Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and chemical toxicology*, 33(12), 1061-1080.
- **García-Ortega, P; Belmonte-Soler, J. Pinos. (2002).** In Polinosis, Polen y Alergia; Eds: Valero-Santiago, A.L., Cadahía-García, Alvaro. Ediciones: España. pp 139-142.
- **George, V. C., Dellaire, G., & Rupasinghe, H. V. (2017).** Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 45, 1-14.
- **Georgiev, V., Ananga, A., & Tsolova, V. (2014).** Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*, 6(1), 391-415.

- **Gezer, C., Yücecan, S., Rattan, S. I. S. (2015).** Artichoke compound cynarin differentially affects the survival, growth, and stress response of normal, immortalized, and cancerous human cells. *Turk. J. Biol.*39, 299-305.
- **Gil, A. G., Arbillaga, L., & López, D. C. A. (2015).** Non-clinical toxicity studies on bioactive compounds within the framework of nutritional and health claims. *International journal of food sciences and nutrition*, **66**, S13.
- **Giordani, M. A. Collicchio, T. C. M. Ascencio S. D. (2015).**Hydroethanolic extract of the inner stem bark of *Cedrela odorata* has low toxicity and reduces hyperglycemia induced by an overload of sucrose and glucose. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 162, pp. 352–361.
- **González-Elizondo, M. Socorro, González-Elizondo, Martha, Tena-Flores, J. A., Ruacho-González, Lizeth, & López-Enríquez, I. Lorena. (2012).** Vegetación de la Sierra Madre Occidental, México: una síntesis. *Acta botánica mexicana*, (100), 351-403.
- **Granato, D., Nunes, D. S., & Barba, F. J. (2017).** An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science & Technology*.
- **Guarrera, P. M., & Savo, V. (2013).** Perceived health properties of wild and cultivated food plants in local and popular traditions of Italy: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(3), 659-680.
- **Hajiaghaalipour, F., Khalilpourfarshbafi, M., & Arya, A. (2015).** Modulation of glucose transporter protein by dietary flavonoids in type 2 diabetes mellitus. *International journal of biological sciences*, 11(5), 508.
- **Havsteen, B. H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96(2), 67-202.
- **Heimler, D., P. Vignolini, M. G. Dini, A. Romani. (2005).** Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. Dry beans. *J. Agric. Food Chem* 53(8): 3053-3056
- **Herrera-Calderon, O., Chinchay-Salazar, R., Palomino-Ormeño, E., Arango-Valencia, E., & Arroyo, J. (2015).** Efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de *Geranium ruizii* Hieron. (pasuchaca) en la hiperglucemia inducida por aloxano en ratas. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 76, No. 2, pp. 117-122).
- **Ho Chi-Tang, Zheng Qun Yi, (2002).** Quality Management of Nutraceuticals, *American Chemical Society*, pp.: 2 – 215
- **Huang D., Boxin, O. Ronald, P.R. (2005)** the Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *Agricultural and Food Chemistry*, pp.: 1841 – 1856.
- **Ibarra, M. L., Batista, C. M., Gómez, B. C., & Zamora, A. L. (2006).** Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en salud*, 8(1), 7-15.
- **Isaza J.H. (2007).**Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia Et Technica* 33:13-18
- **Jaiswal, D., Rai, P. K., Kumar, A., Mehta, S., & Watal, G. (2009).** Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. *Journal of ethnopharmacology*, **123(3)**, 392-396.

- **Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Gabaldón-Hernández, J. A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2015).** RP-HPLC–ESI–QTOF/MS 2 based strategy for the comprehensive metabolite profiling of *Sclerocarya birrea* (*marula*) bark. *Ind. Crops Prod.*, 71, 214-234.
- **Jin, D., Xua, Y., Meia, X., (2013).** Antiobesity and lipid lowering effects of theaflavins on high-fat diet induced obese rats. *Journal of functional Foods*, 5, 1142–1150.
- **Johar, D. R., & Bernstein, L. H. (2017).** Biomarkers of stress-mediated metabolic deregulation in diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*. Volume 126, Pages 222-229.
- **Kar, A., Mukherjee, P. K., Saha, S., Bahadur, S., Ahmmed, S. K., & Pandit, S. (2015).** Possible herb-drug interaction of *Morus alba* L.-a potential anti-diabetic plant from Indian Traditional medicine. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. 14 (4).626-631.
- **Karonen, M., Hämäläinen, M., Nieminen, R., Klika, K. D., Loponen, J., Ovcharenko, V. V. Pihlaja, K. (2004).** Phenolic extractives from the bark of *Pinus sylvestris* L. and their effects on inflammatory mediators nitric oxide and prostaglandin E2. *J. Agric. Food. Chem.* 52, 7532-7540.
- **Kaur, M., Barwal, A., & Kumari, S. (2016).** Diabetes mellitus: an incisive review international *journal of pharmaceuticals & drug analysis*. 4 (11), 494.
- **Kawser Hossain, M., Abdal Dayem, A., Han, J., Yin, Y., Kim, K., Kumar Saha, S. & Cho, S. G. (2016).** Molecular mechanisms of the anti-obesity and anti-diabetic properties of flavonoids. *International journal of molecular sciences*, 17(4), 569.
- **Kchaou, W., Abbès, F., Blecker, C., Attia, H., & Besbes, S. (2013).** Effects of extraction solvents on phenolic contents and antioxidant activities of Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.). *Industrial crops and products*, 45, 262-269.
- **Keshari, A. K., Kumar, G., Kushwaha, P. S., Bhardwaj, M., Kumar, P., Rawat, A. & Saha, S. (2016).** Isolated flavonoids from *Ficus racemosa* stem bark possess antidiabetic, hypolipidemic and protective effects in albino Wistar rats. *Journal of ethnopharmacology*, 181, 252-262.
- **Kim, H. M., & Kim, J. (2013).** The effects of green tea on obesity and type 2 diabetes. *Diabetes & metabolism journal*, 37(3), 173-175.
- **Kohei, K. A. K. U. (2010).** Pathophysiology of type 2 diabetes and its treatment policy. *JMAJ*, 53(1), 41-46.
- **Köhle, C., & Bock, K. W. (2006).** Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochemical pharmacology*, 72(7), 795-805.
- **Kong, W. J., Wei, J., Zuo, Z. Y., et al. (2008).** Combination of simvastatin with berberine improves the lipid-lowering efficacy. *Metabolism*, 57, 1029–1037.
- **Kong, W., Wei, J., Abidi, P., et al. (2004).** Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nature Medicine*, 10, 1344–1351.

- **Ku, C.S.; Mun, S.P. 2008.** Antioxidant properties of monomeric, oligomeric, and polymeric fractions in hot water extract from *Pinus radiata* bark. *Wood Science and Technology* 42(1):47-60.
- **Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013).** Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*. Article ID 162750, 16 pages. doi.org/10.1155/2013/162750.
- **Kumar, S., Yadav, A., Yadav, M., & Yadav, J. P. (2017).** Effect of climate change on phytochemical diversity, total phenolic content and *in vitro* antioxidant activity of *Aloe vera* (L.) Burm. f. *BMC research notes*, 10(1), 60.
- **Kwon, Y. I., Apostolidis, E., and Shetty, K. (2008).** *In vitro* studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresource Technology*. 99(8), 2981–2988.
- **Larussa, T., Imeneo, M., & Luzzza, F. (2017).** Potential role of nutraceutical compounds in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 23(14), 2483.
- **Letelier, M., Eduardo, C., San Martín Ojeda, C. A., Ruiz Provoste, J. J., & Frugone Zaror, C. J. (2017).** Fisiopatología de la nefropatía diabética: una revisión de la literatura. *Medwave*, 17(01).
- **Li, Y. Y., Feng, J., Zhang, X. L., & Cui, Y. Y. (2015).** Pine bark extracts: nutraceutical, pharmacological, and toxicological evaluation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 353(1), 9-16.
- **Lordan, S. Smyth, T. J. Soler-Vila, A Stanton, C. and Ross, R. P.(2013).** The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of *Irish seaweed* extracts,” *Food Chemistry*.141(3) 2170–2176.
- **Lorenz, P., Heinrich, M., Garcia-Käufer, M., Grunewald, F., Messerschmidt, S., Herrick, A., Steinborn, C. (2016).** Constituents from oak bark (*Quercus robur* L.) inhibit degranulation and allergic mediator release from basophils and mast cells *in vitro*. *J. Ethnopharmacol.* 194, 642-650.
- **Luca, V. S, Miron, A. and Aprotosoie, A. C. (2016).** The antigenotoxic potential of dietary flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 15,(4), 591–625.
- **Luna-José, A. D. L., Montalvo-Espinosa, L., & Rendón-Aguilar, B. E. A. T. R. I. Z. (2003).** Los usos no leñosos de los encinos en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 72(1), 107-117.
- **Maki, K. C., Lawless, A. L., Reeves, M. S., et al. (2012).** Lipidaltering effects of a dietary supplement tablet containing free plant sterols and stanols in men and women with primary hypercholesterolaemia: A randomized, placebo-controlled crossover trial. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63, 476–482.
- **Maldonado Saavedra, O., Ramírez Sánchez, I., García Sánchez, J. R., Ceballos Reyes, G. M., & Méndez Bolaina, E. (2012).** Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43(2), 7-22.
- **Mämmelä, P., Savolainen, H., Lindroos, L., Kangas, J., Vartiainen, T. (2000).** Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J.Chromatogr. A*, 891, 75-83.

- **Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- **Mandukhail, S. U. R., Aziz, N., & Gilani, A. H. (2010).** Studies on antidyslipidemic effects of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit, leaves and root extracts. *Lipids in health and disease*, 9(1), 88.
- **Manigandan, K.; Jayaraj, R.L.; Jagatheesh, K.; Elangovan, N. 2015.** Taxifolin mitigates oxidative DNA damage in vitro and protects zebrafish (*Danio rerio*) embryos against cadmium toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 9(3):1252-1261.
- **Manzano S. and Williamson, G.(2010).** Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 54, no. 12, pp. 1773–1780.
- **Marazzi, G., Cacciotti, L., Pelliccia, F., Iaia, L., Volterrani, M., Caminiti, G., & Rosano, G. (2011).** Long-term effects of nutraceuticals (berberine, red yeast rice, policosanol) in elderly hypercholesterolemic patients. *Advances in therapy*, 28(12), 1105-1113.
- **Martínez-Abundis, E., Mendez-del Villar, M., Pérez-Rubio, K. G., Zuñiga, L. Y., Cortez-Navarrete, M., Ramírez-Rodríguez, A., & González-Ortiz, M. (2016).** Novel nutraceutical therapies for the treatment of metabolic syndrome. *World journal of diabetes*, 7(7), 142.
- **Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. (2002).** Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 17(6), 271-278.
- **Martins, A., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I. P., Barreiro, F., & Ferreira, I. C. (2014).** Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schott flowers: characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources. *Food & function*, 5(6), 1091-1100.
- **Márquez, Y. K., Alvear, S., Montellano, H., & Meléndez, M. E. (2008).** Efecto antiinflamatorio de *Pinus leiophylla* Schlechtendal & Cham. en la rata. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(2), 22-27.
- **Metzger, B. T., Barnes, D. M., & Reed, J. D. (2009).** A comparison of pectin, polyphenols, and phytosterols, alone or in combination, to lovastatin for reduction of serum lipids in familial hypercholesterolemic swine. *Journal of Medicinal Food*, 12, 854–860.
- **Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
- **Moradi, M. T., Karimi, A., & Alidadi, S. (2016).** *In vitro* antiproliferative and apoptosis-inducing activities of crude ethyle alcohol extract of *Quercus brantii* L. acorn and subsequent fractions. *Chinese journal of natural medicines*, 14(3), 196-202.
- **Moreno-Jimenez, M. R., Trujillo-Esquivel, F., Gallegos-Corona, M. A., Reynoso-Camacho, R., González-Laredo, R. F., Gallegos-Infante, J. A., &**

- Ramos-Gomez, M. (2015).** Antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities of edible red oak (*Quercus spp.*) infusions in rat colon carcinogenesis induced by 1, 2-dimethylhydrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 144-153
- **Muccilli, V., Cardullo, N., Spatafora, C., Cunsolo, V. Tringali, C. (2017).** α -Glucosidase inhibition and antioxidant activity of an oenological commercial tannin. Extraction, fractionation and analysis by HPLC/ESI-MS/MS and ¹H NMR. *Food Chem.* 215, 50-60.
 - **Na, H. K., & Surh, Y. J. (2008).** Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food and Chemical Toxicology*, 46(4), 1271-1278
 - **Nepote, V.; R Grosso, N.; Guzman, C. 2005.** Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:33-38.
 - **Ouedraogo, M., Baudoux, T., Stévigny, C., Nortier, J., Colet, J. M., Efferth, T. & Pelkonen, O. (2012).** Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. *Journal of ethnopharmacology*, 140(3), 492-512.
 - **Ozougwu, J. C., Obimba, K. C., Belonwu, C. D., & Unakalamba, C. B. (2013).** The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology*, 4(4), 46-57.
 - **Pandey, M., Verma, R. K., & Saraf, S. A. (2010).** Nutraceuticals: new era of medicine and health. *Asian J Pharm Clin Res*, 3(1), 11-15.
 - **Panico, A.M., Cardile, V., Avondo, S., Garufi, F., Gentile, B., Puglia, C., Bonina, F., Santagati, N.A., Ronsisvalle, G. (2006).** The *in vitro* effect of a lyophilized extract of wine obtained from jacquez grapes on human chondrocytes. *Phytomedicine*.13, 522–526.
 - **Panieri, E., Gogvadze, V., Norberg, E., Venkatesh, R., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2013).** Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence. *Free Radical Biology and Medicine*, 57, 176-187.
 - **Pardo-García, A. I., Martínez-Gil, A. M., Cadahía, E., Pardo, F., Alonso, G. L., Salinas, M. R. (2014).** Oak extract application to grapevines as a plant biostimulant to increase wine polyphenols. *Food Res Int.* 55, 150-160.
 - **Parra, A. L., Yhebra, R. S., Sardiñas, I. G., & Buela, L. I. (2001).** Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. 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.
 - **Parveen, K. Khan, M. R., Mujeeb, M. and Siddiqui, W. A. (2010).** Protective effects of Pycnogenol on hyperglycemia-induced oxidative damage in the liver of type 2 diabetic rats. *Chemico Biological Interactions*, vol. 186, no. 2, pp. 219–227.
 - **Pérez Trueba, G. (2003).** Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1).

- **Penumetcha, M., & Santanam, N. (2012).** Nutraceuticals as ligands of PPAR. *PPAR research*, Article ID 858352, 7 pages doi:10.1155/2012/858352.
- **Pinelo, M.; Rubilar, M.; Jerez, M.; Sineiro, J.; Nuñez, M.J. 2005.** Effect of solvent, temperature and solvent-to. Solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2111-2117.
- **Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015).** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
- **Prakash, D., & Gupta, K. R. (2009).** The antioxidant phytochemicals of nutraceutical importance. *Open Nutraceuticals J*, 2, 20-35.
- **Prasain, J. K., Carlson, S. H., & Wyss, J. M. (2010).** Flavonoids and age-related disease: risk, benefits and critical windows. *Maturitas*, 66(2), 163-171.
- **Prestegui-Martel, B., Bermúdez-Lugo, J. A., Chávez-Blanco, A., Dueñas-González, A., García-Sánchez, J. R., Pérez-González, O. A., & Méndez-Luna, D. (2016).** N-(2-hydroxyphenyl)-2-propylpentanamide, a valproic acid aryl derivative designed *in silico* with improved anti-proliferative activity in HeLa, rhabdomyosarcoma and breast cancer cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(3), 140-149.
- **Rajasekaran, A., Sivakumar, V., & Darlinquine, S. (2013).** Effect of *Blepharis maderaspatensis* L. Roth. extracts on serum lipids in Triton WR-1339 and high cholesterol diet induced hyperlipidemia in rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(37), 2577-2583.
- **Ramaa C.; Shirode A.; Mundada A.; Kadam V. (2006).** Nutraceuticals-An emerging era in the treatment and prevention of cardiovascular diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 7(1) 15-23
- **Ramchoun, M., Harnafi, H., Alem, C., Benlyas, M., Elrhaffari, L., & Amrani, S. (2009).** Study on antioxidant and hypolipidemic effects of polyphenol-rich extracts from *Thymus vulgaris* and *Lavendula multifida*. *Pharmacognosy Research*, 1(3), 106.
- **Ramos, V.; Bocalandro, C.; Riquelme, S.; Sanhueza, V.; Aspé, E.; Roedel, M.; Fernández, K. 2013.** Effect of the bench scale extraction conditions on *Pinus radiata* bark extract yield, antioxidant properties and composition. *Maderas. Ciencia y Tecnología* 15(1):31-44.
- **Rana, S., & Bhushan, S. (2016).** Apple phenolics as nutraceuticals: assessment, analysis and application. *Journal of food science and technology*, 53(4), 1727-1738
- **Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans. (1999).** Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26 (9, 10): 1231- 1237.
- **Rivera-Ramírez, F. Escalona-Cardoso, G. N., Garduño Siciliano, L., Galaviz-Hernández, C., and Paniagua-Castro. N. (2011).** Antiobesity and hypoglycaemic effects of aqueous extract of *Ibervillea sonora* in mice fed a high-fat diet with fructose. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Article ID 968984, 6 pages.

- **Rohdewald, P. J. (2005).** Pycnogenol®, French maritime pine bark extract. *Encyclopedia of dietary supplements*, 545-553.
- **Roleira, F. M., Tavares-da-Silva, E. J., Varela, C. L., Costa, S. C., Silva, T., Garrido, J., & Borges, F. (2015).** Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry*, 183, 235-258.
- **Ros, J.L., Francini, F., Schinella, G.R., (2015).** Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Planta Med.* 81, 975–994.
- **Rosales-Castro, M. & González-Laredo, R. (2003).** Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. *Madera y Bosques* 9(2): 41-49.
- **Rosales-Castro, M., Pérez-López, M. E., & Ponce-Rodríguez, M. D. C. (2006).** Propiedades antirradicales libres y antibacterianas de extractos de corteza de pino. *Madera y Bosques*, 12(1), 37-49.
- **Rosales-Castro, M.; González-Laredo, R. F.; Rocha-Guzmán, N. E.; Gallegos-Infante, J. A.; Peralta-Cruz, J.; Karchesy, J. J. 2009.** Evaluación química y capacidad antioxidante de extractos polifenólicos de cortezas de *Pinus cooperi*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* y *P. teocote*. *Madera y Bosques* 15(3):87-105.
- **Rosales-Castro, M., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Rivas-Arreola, M. J., & Karchesy, J. J. (2012).** Antioxidant activity of fractions from *Quercus sideroxyla* bark and identification of proanthocyanidins by HPLC-DAD and HPLC-MS.
- **Rosales-Castro, M., González-Laredo, R.F., Rivas-Arreola M.J. & Karchesy J. (2017).** Chemical analysis of polyphenols with antioxidant capacity from *Pinus durangensis* bark. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 1-12. DOI:10.1080/02773813.2017.1310898
- **Ruiz, S., Pergola, P. E., Zager, R. A., & Vaziri, N. D. (2013).** Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney international*, 83(6), 1029.
- **Sadeghi-Aliabadi, H., Mosavi, H., Mirian, M., Kakhki, S., & Zarghi, A. (2012).** The Cytotoxic and Synergistic Effects of Flavonoid Derivatives on Doxorubicin Cytotoxicity in Hela, MDA-MB-231, and HT-29 Cancer Cells. *Iranian Journal of Toxicology*, 5(15), 558-564.
- **Santini, A., Tenore, G. C., & Novellino, E. (2017).** Nutraceuticals: A paradigm of proactive medicine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 53-61.
- **Santos, S. A., Villaverde, J. J., Sousa, A. F., Coelho, J. F., Neto, C. P., Silvestre, A. J. (2013).** Phenolic composition and antioxidant activity of industrial cork by-products. *Ind. Crops Prod.*, 47, 262-269.
- **Sarikurcu, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abali, G., & Mete, E. (2009).** Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitexagnuscastus* L. fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10), 2479-2483.

- **Sarvmeili, N., Jafarian-Dehkordi, A., & Zolfaghari, B. (2016).** Cytotoxic effects of *Pinus eldarica* essential oil and extracts on HeLa and MCF-7 cell lines. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(6), 476.
- **Schäfer, Angelika, Hoßger Petra. (2007).** ligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol®) effectively inhibit α -glucosidase. *Diabetes Research and Clinical Practice* .77 (1), 41 – 46.
- **Shaw, D., Graeme, L., Pierre, D., Elizabeth, W., & Kelvin, C. (2012).** Pharmacovigilance of herbal medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 140(3), 513-518.
- **Shoji Y. & Nakashima H. Nutraeutics and delibery systems. (2004).** *Journal of drugs targeting*.12 (6), 385-391
- **Sikarwar, M. S., & Patil, M. B. (2015).** Anti-hyperlipidemic activity of *Crataeva nurvala* Buch-Hum ethanolic extract fractions. *Sifa Medical Journal*, 2(2), 31.
- **Şöhretoğlu, D., Sabuncuoğlu, S., Harput, Ü. Ş. (2012).** Evaluation of antioxidative, protective effect against H₂O₂ induced cytotoxicity, and cytotoxic activities of three different *Quercus* species. *Food Chem. Toxicol.* 50, 141-146
- **Soto-García, M., & Rosales-Castro, M. (2016).** Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 2016, vol.18, n.4 pp.701-71
- **Soto-García, M., Rosales-Castro, M., Escalona-Cardoso, G. N., & Paniagua-Castro, N. (2016).** Evaluation of Hypoglycemic and Genotoxic Effect of Polyphenolic Bark Extract from *Quercus sideroxylla*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016. 7 pages. doi.org/10.1155/2016/4032618
- **Spigno, G.; Tramelli, L.; De Faveri, D. M. 2007.** Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81(1):200-208.
- **Studzińska-Sroka, E., Piotrowska, H., Kucińska, M., Murias, M., Bylka, W. (2016).** Cytotoxic activity of physodic acid and acetone extract from *Hypogymnia physodes* against breast cancer cell lines. *Pharm Biol.* 54, 2480-2485.
- **Sugamura, K., & Keaney, J. F. (2011).** Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 978-992.
- **Sulaiman, S.F.; Sajak, A.A.B.; Ooi, K.L.; Seow, E.M. 2011.** Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis* 24(4):506-515.
- **Sung, B., Prasad, S., Gupta, S.C., Patchva, S., Aggarwal, B.B. (2012).** Regulation of Inflammation-Mediated Chronic Diseases by Botanicals. In *Advances in Botanical Research: Recent trends in Medicinal Plants Research*. Shyur, L.-F., Ed. Academic Press: Oxford, UK. Volume 62, pp. 57–132.

- **Tan, K. W., & Kassim, M. J. (2011).** A correlation study on the phenolic profiles and corrosion inhibition properties of mangrove tannins (*Rhizophora apiculata*) as affected by extraction solvents. *Corrosion Science*, 53(2), 569-574.
- **Tanko, Y., Yerima, M., Mahdi, M. A., Yaro, A. H., Musa, K. Y., & Mohammed, A. (2008).** Hypoglycemic activity of methanolic stem bark of *Adansonia digitata* extract on blood glucose levels of streptozocin-induced diabetic wistar rats. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 1(2), 32-36.
- **Trabelsi, N.; Megdiche, W.; Ksouri, R.; Falleh, H.; Oueslati, S.; Soumaya, B.; Abdelly, C. 2010.** Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT-Food Science and Technology* 43(4):632-639.
- **Umeno, A., Horie, M. Murotomi, K., Nakajima, Y, and Yoshida Y. (2016).** Antioxidative and antidiabetic effects of natural polyphenols and isoflavones. *Molecules*, vol. 21, no. 6, article 708.
- **Vasconcelos C.F.B, Maranhão H.M.L., Batista T.M., Carneiro E.M, Ferreira F., Costa J., Soares L.A.L., Sá M.D.C., Souza T.P., Wanderley A.G. (2011).** Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 137 (2011) 1533– 1541
- **Vattem, D. A., & Maitin, V. (Eds.). (2015).** Functional Foods, Nutraceuticals and Natural Products: Concepts and Applications. *DEStech Publications, Inc*
- **Vongsak, B., Kongkiatpaiboon, S., Jaisamut, S., Machana, S., & Pattarapanich, C. (2015).** In vitro alpha glucosidase inhibition and free-radical scavenging activity of propolis from Thai stingless bees in mangosteen orchard. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(5), 445-450.
- **Weidner, C., de Groot, J. C., Prasad, A., Freiwald, A., Quedenau, C., Kliem, M., & Baumann, M. (2012).** Amorphutins are potent antidiabetic dietary natural products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(19), 7257-7262.
- **Yahia, E. M. (2010).** The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. *Fruit and vegetable phytochemicals*, 3-51.
- **Ye, Z. W., Zhang, J., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2015).** Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(8), 1607-1621.
- **Yeh, W. J., Hsia, S-M., Lee, W-H., & Wu, C-H. (2017).** Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), 84-92. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.10.017
- **Zhang, H., & Tsao, R. (2016).** Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33-42.

AGRADECIMIENTOS

Aunque no existen las palabras suficientes cuanto la gratitud desborda el alma, he querido expresar mi profundo agradecimiento a Dios por tan bella experiencia...

A mi familia, por ser, estar, existir... gracias por su apoyo, paciencia y tiempo que cedieron; sobre todo a mis pequeñas que muchas veces no entendían a mamá... Mi gratitud infinita... simplemente los amo!

A mis padres siempre presentes, siempre apoyando...tan llenos del amor que solo ellos son capaces de profesar, esto también es de ustedes.

A mi bella e inteligente mamá que junto a mí ha estado en cada etapa profesional de mi vida, ejemplo de entereza y modelo a seguir como madre... siempre tan preocupada por mi familia y por mí, mil gracias!

A mis hermanos por sus palabras de aliento, siempre oportunas.

A mis directoras de tesis: Dra. Martha Rosales Castro y Dra. Norma Paniagua Castro por sus contribuciones al desarrollo de este trabajo, pero más por su ejemplo, por todas las enseñanzas que quedan fuera de un aula, por ser inspiración como excelentes científicas y madres, gracias!

A los doctores: Yolanda Herrera Arrieta, Martha Sosa Macías y Carlos Galaviz Hernández, por tan importantes aportaciones al mejoramiento de este trabajo de investigación.

A los doctores: María José Rivas Arreola, Blanca Lazalde, Rubén Sánchez y M.C. Gerardo Escalona por compartir conmigo un poco del gran conocimiento que poseen.

A mis compañeras de laboratorio: Sandra, Neydi, Favi Alcántara, Lupita Pérez, Dulce Almonte, Samantha Mariscal y Fausto, por hacer aún más interesantes los días de trabajo experimental...

A Mayra Burciaga por sus finas atenciones en todo momento.

A todos quienes en este caminar estuvieron y sobre todo creyeron en mí...Gracias Dra. Martha Rosales por la oportunidad...

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (368494) para mis estudios doctorales.

CIIDIR-IPN Unidad Durango, por las facilidades otorgadas durante la realización de esta tesis doctoral.

Al Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional, por la infraestructura experimental facilitada.

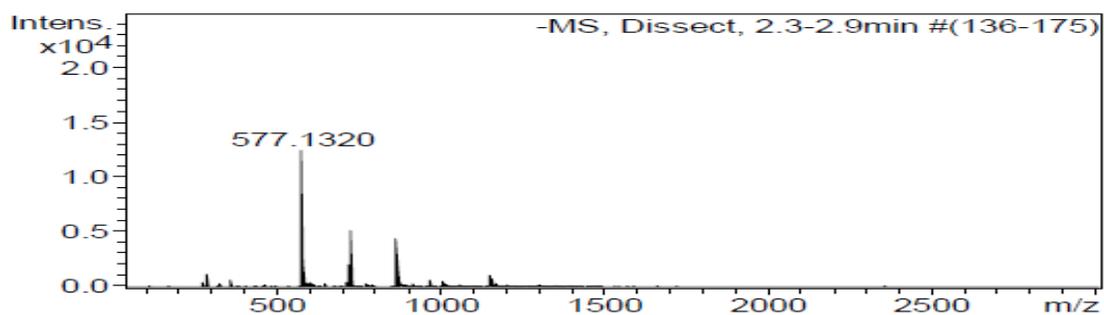
A las instituciones COCYTED y BEIFI por las contribuciones financieras otorgadas como apoyo complementario para las actividades realizadas en este trabajo de investigación.

ANEXO A.

Espectro de masas de los compuestos elucidados en el punto 8.2.2.

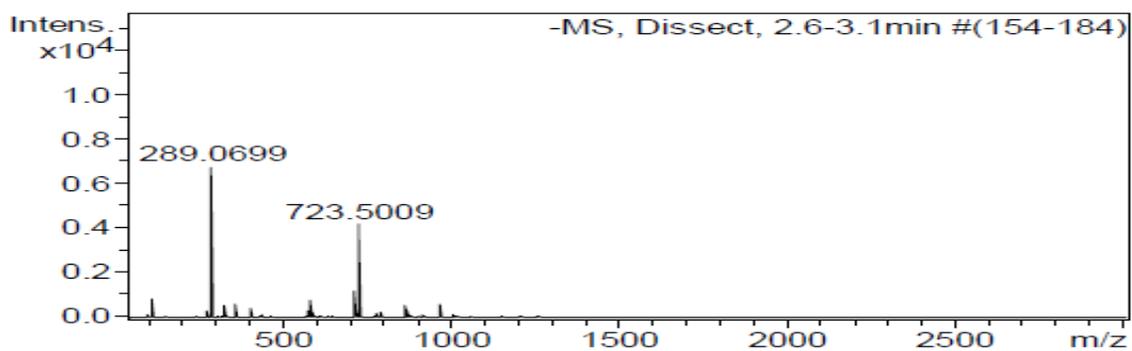
P. durangensis

Cmpd 11, Dissect, 2.6 min



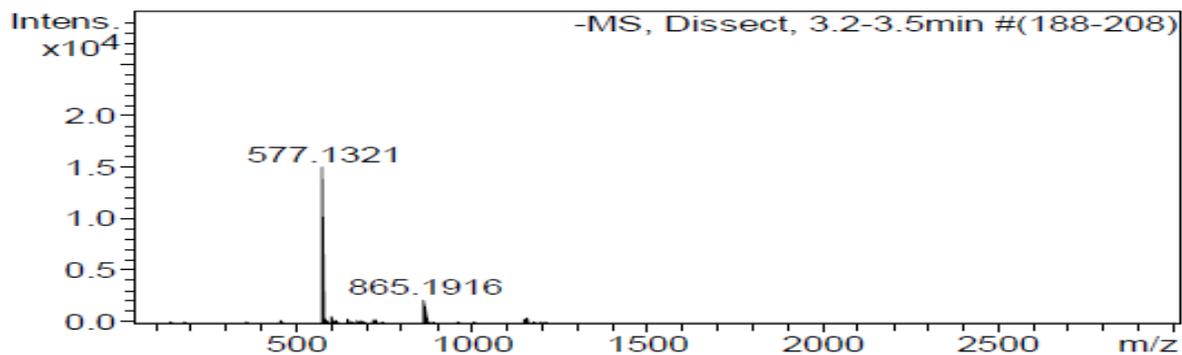
#	m/z	I
1	576.1280	2983
2	576.6307	1959
3	577.1320	12417
4	578.1356	3811
5	579.1445	1922
6	720.1615	2046
7	723.5012	5181
8	724.5040	2349
9	865.1931	4423
10	866.1969	2082

Cmpd 12, Dissect, 2.7 min



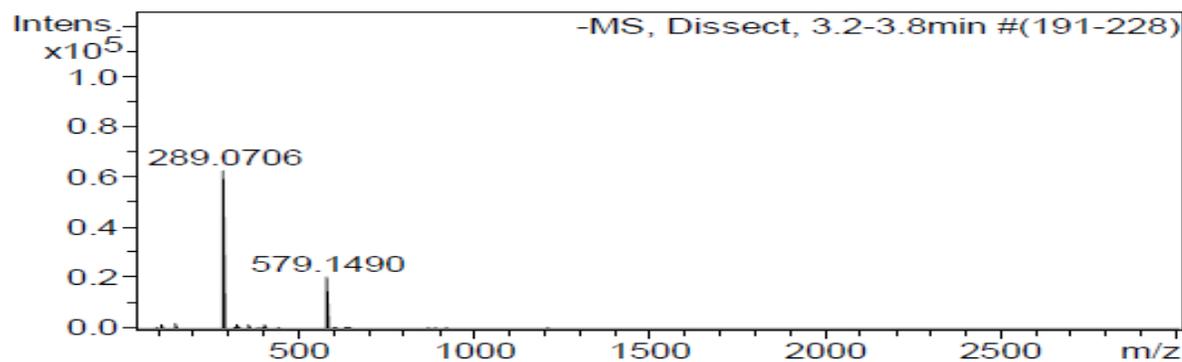
#	m/z	I
1	112.9828	845
2	289.0699	6759
3	290.0731	1082
4	357.0579	587
5	579.1460	796
6	713.4717	1186
7	723.5009	4173
8	724.5041	1421
9	865.1920	549
10	866.1969	2082

Cmpd 15, Dissect, 3.3 min



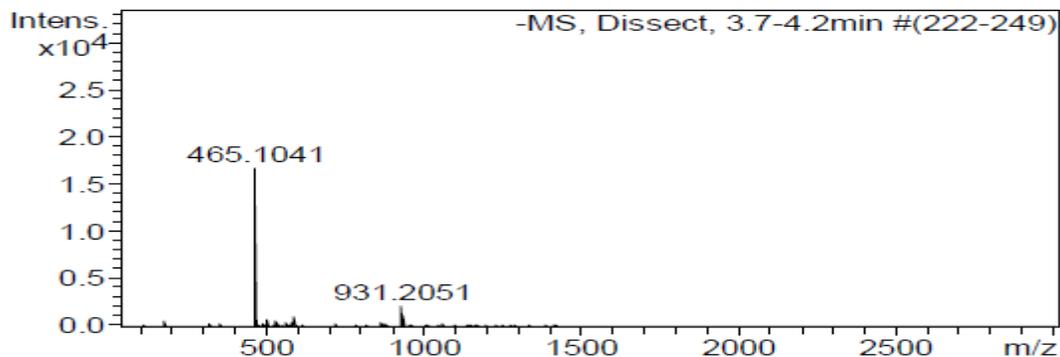
#	m/z	I
1	575.1152	524
2	576.1270	1186
3	576.6304	853
4	577.1321	15043
5	578.1362	4864
6	579.1391	505
7	599.1149	603
8	865.1916	2239
9	866.1938	1225
10	1155.2640	525

Cmpd 16, Dissect, 3.5 min



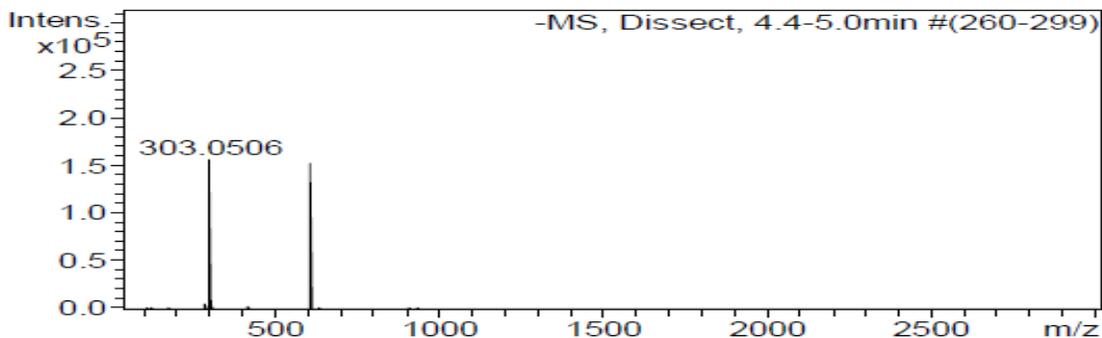
#	m/z	I
1	153.0172	2408
2	289.0706	62726
3	290.0737	9696
4	291.0749	1623
5	325.0462	1518
6	357.0573	1914
7	403.0634	1599
8	579.1490	20461
9	580.1518	6620
10	581.1536	1889

Cmpd 19, Dissect, 3.9 min



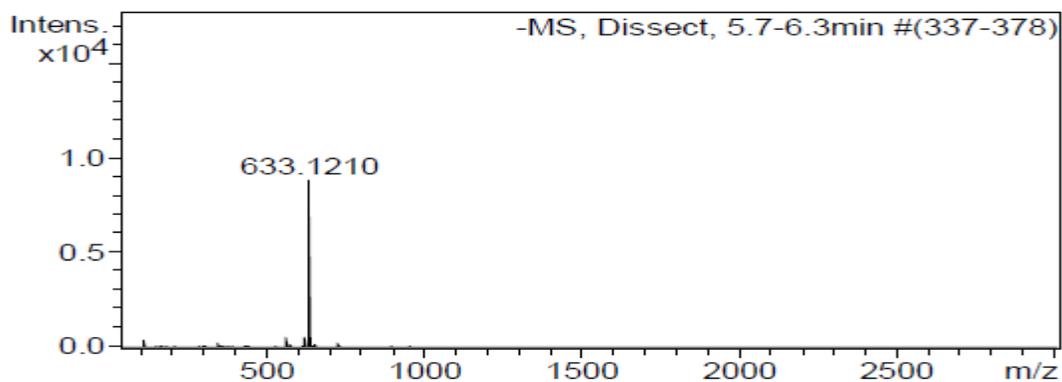
#	m/z	I
1	179.0331	657
2	465.1041	16710
3	466.1074	4163
4	467.1075	964
5	501.0793	772
6	533.0931	519
7	591.1162	962
8	865.1910	432
9	931.2051	2105
10	932.2109	1101

Cmpd 25, Dissect, 4.6 min



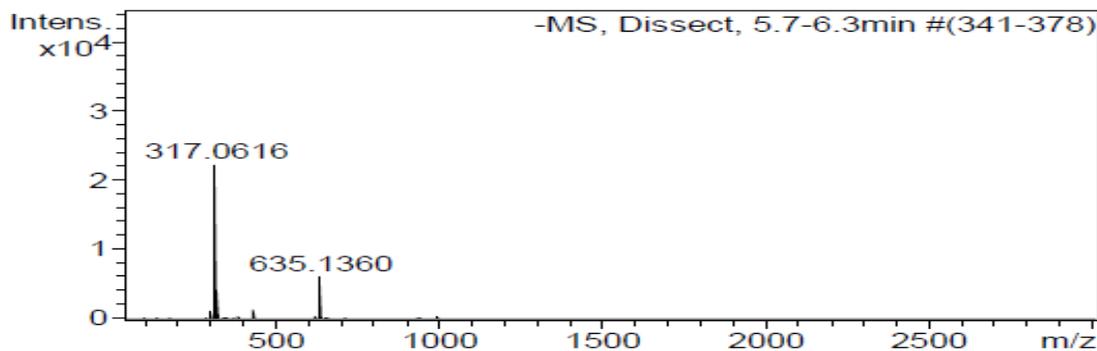
#	m/z	I
1	285.0392	5628
2	303.0506	156444
3	304.0530	22249
4	305.0535	4070
5	417.0437	3004
6	607.1086	151857
7	608.1107	47019
8	609.1124	11716
9	610.1151	1931
10	633.5677	1662

Cmpd 34, Dissect, 5.9 min



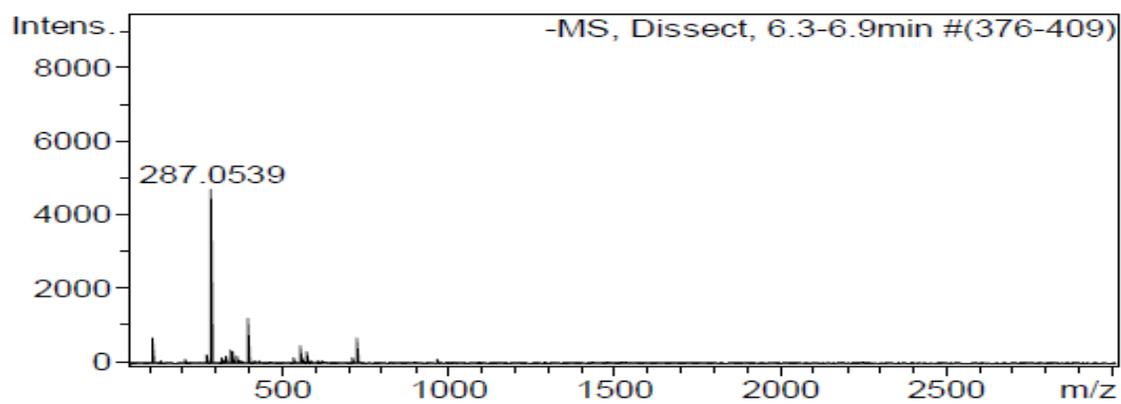
#	m/z	I
1	112.9829	403
2	349.1996	248
3	561.1003	521
4	619.1122	509
5	633.1210	8820
6	634.1234	3611
7	635.1297	999
8	636.1316	159
9	723.5026	159
10	724.5017	225

Cmpd 36, Dissect, 6.1 min



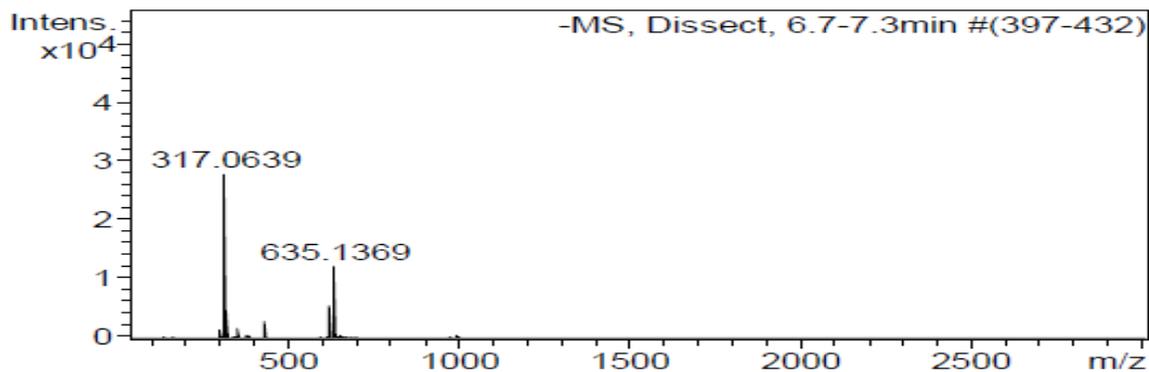
#	m/z	I
1	299.0544	1226
2	317.0616	22244
3	318.0660	4168
4	319.0655	801
5	385.0494	440
6	431.0558	1277
7	635.1360	6079
8	636.1380	2195
9	637.1415	529
10	995.5639	408

Cmpd 39, Dissect, 6.5 min



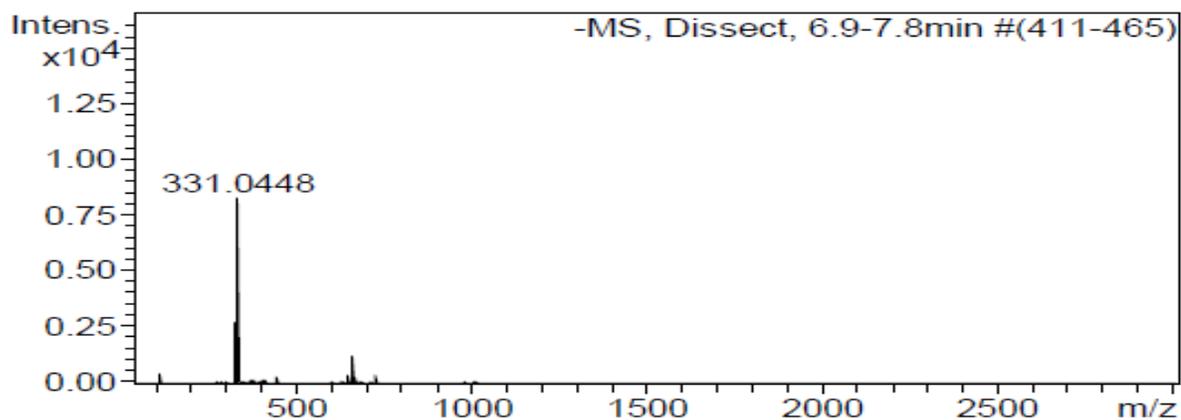
#	m/z	I
1	112.9830	692
2	287.0539	4706
3	288.0565	824
4	349.0540	350
5	349.1999	353
6	351.0666	321
7	401.0477	1200
8	559.1217	456
9	575.1179	311
10	723.5020	667

Cmpd 40, Dissect, 6.9 min



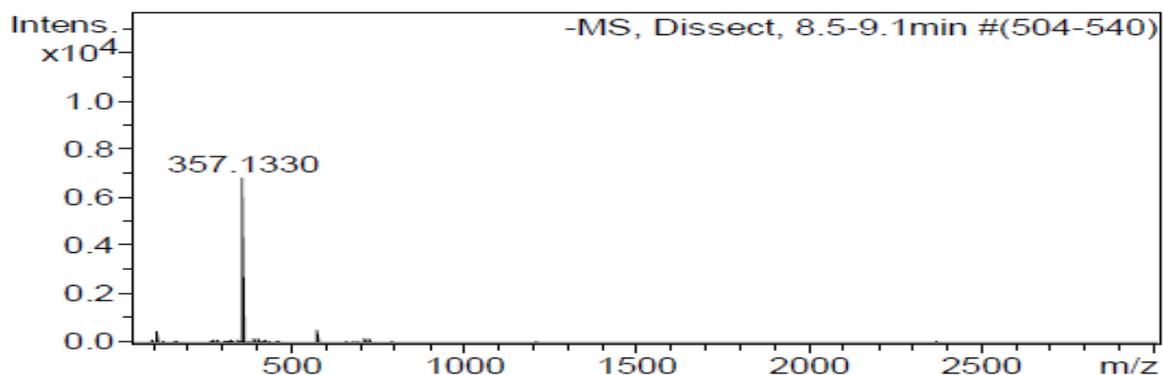
#	m/z	I
1	301.0336	1353
2	315.0441	2043
3	317.0639	27781
4	318.0674	4643
5	353.0416	1514
6	431.0596	2722
7	619.1060	5546
8	620.1092	2062
9	635.1369	12173
10	636.1392	4892

Cmpd 41, Dissect, 7.1 min



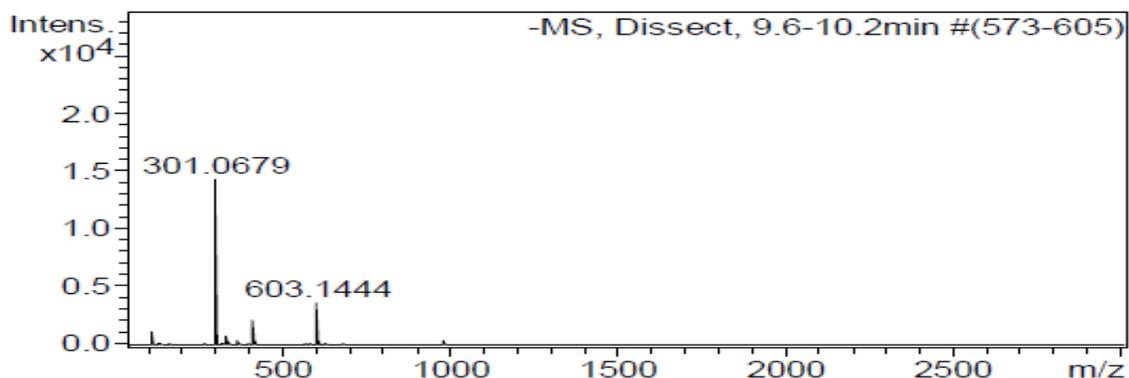
#	m/z	I
1	112.9825	406
2	329.0290	2685
3	330.0334	291
4	331.0448	8250
5	332.0478	1420
6	445.0385	260
7	649.1050	355
8	663.0957	1213
9	664.0988	309
10	723.5012	329

Cmpd 50, Dissect, 8.7 min



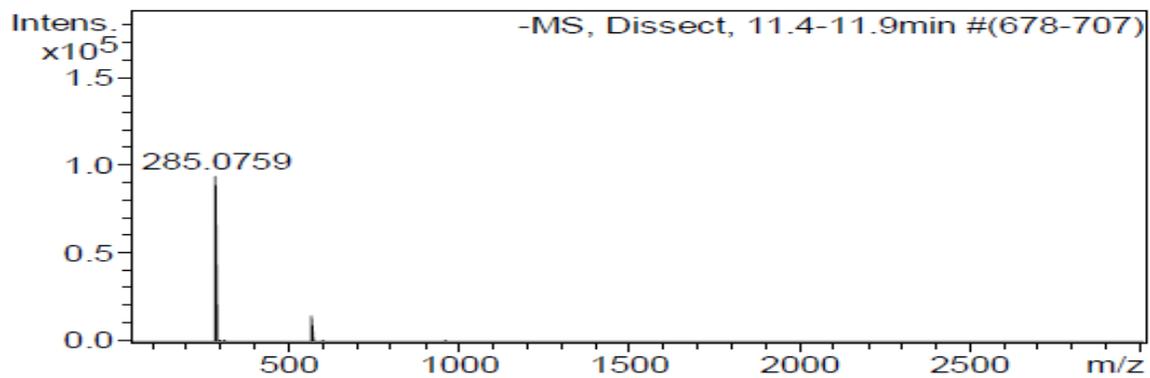
#	m/z	I
1	112.9828	461
2	357.1330	6805
3	358.1357	1617
4	359.1395	271
5	393.1104	153
6	403.1361	168
7	575.1152	551
8	576.1177	165
9	713.4727	173
10	724.5039	159

Cmpd 58, Dissect, 9.9 min



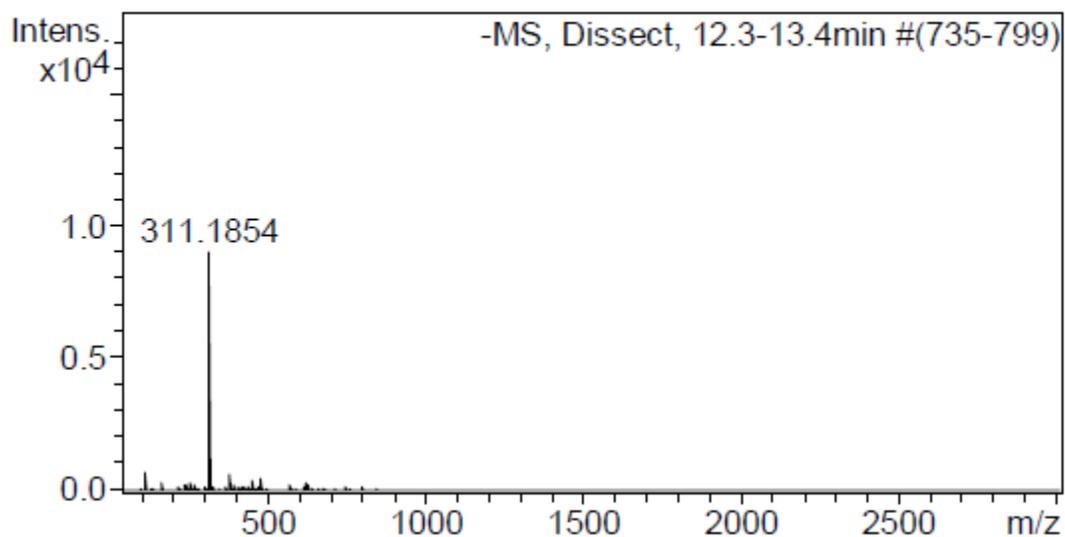
#	m/z	I
1	112.9829	1091
2	301.0679	14281
3	302.0706	2668
4	337.0478	804
5	369.0546	405
6	415.0615	2097
7	416.0647	369
8	603.1444	3591
9	604.1487	1235
10	979.5655	434

Cmpd 70, Dissect, 11.6 min



#	m/z	I
1	285.0759	93901
2	286.0788	18155
3	287.0810	2275
4	301.0340	1017
5	315.0492	876
6	571.1588	14373
7	572.1628	5150
8	573.1627	1144
9	601.1337	801
10	963.5756	760

Cmpd 77, Dissect, 12.5 min

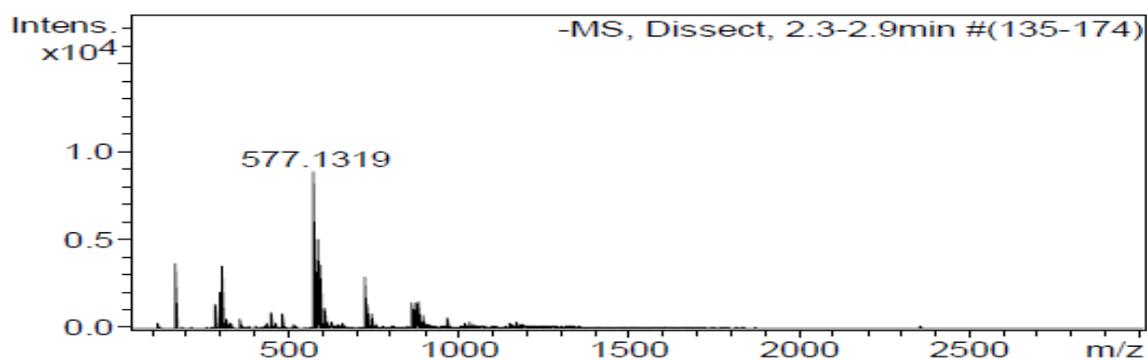


#	m/z	I
1	112.9830	721
2	165.0380	311
3	257.2098	284
4	311.1854	9039
5	312.1888	2392
6	377.2726	595
7	378.2739	468
8	449.3113	401
9	477.2694	496
10	623.3862	281

Espectro de masas de los compuestos elucidados en el punto 8.2.2.

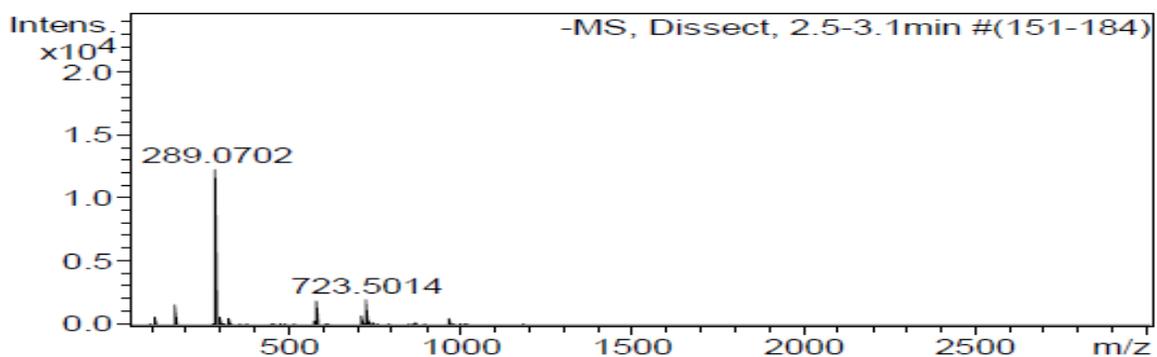
Q. sideroxyla

Cmpd 6, Dissect, 2.6 min



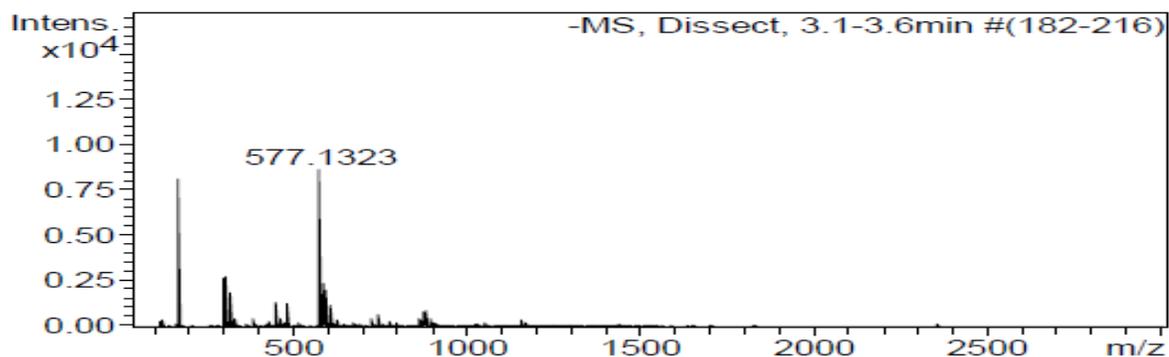
#	m/z	I
1	169.0119	3674
2	303.0489	2051
3	305.0646	3516
4	577.1319	8868
5	578.1352	3222
6	579.1459	3225
7	591.1110	5024
8	592.1154	1759
9	593.1261	3612
10	723.5006	2942

Cmpd 7, Dissect, 2.7 min



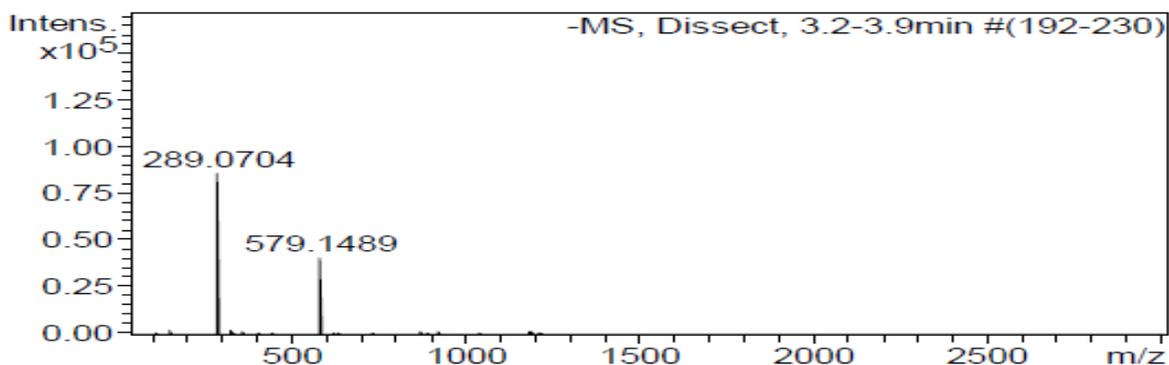
#	m/z	I
1	112.9827	694
2	169.0119	1545
3	289.0702	12300
4	290.0739	1586
5	303.0492	673
6	579.1468	1934
7	580.1497	696
8	713.4707	716
9	723.5014	2047
10	724.5031	1036

Cmpd 10, Dissect, 3.2 min



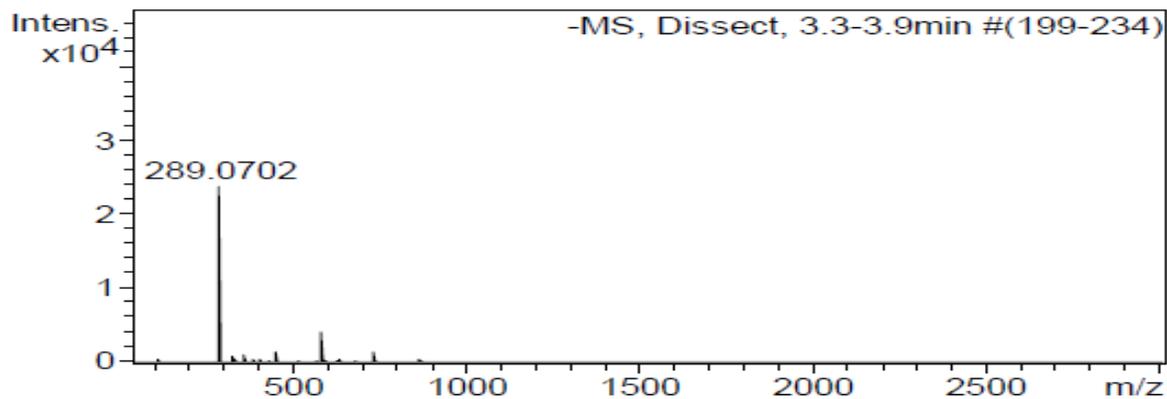
#	m/z	I
1	169.0118	8116
2	303.0498	2708
3	305.0642	2745
4	321.0595	1855
5	453.1017	1367
6	577.1323	8619
7	578.1346	3149
8	579.1449	1516
9	591.1107	2376
10	593.1266	1996

Cmpd 12, Dissect, 3.5 min



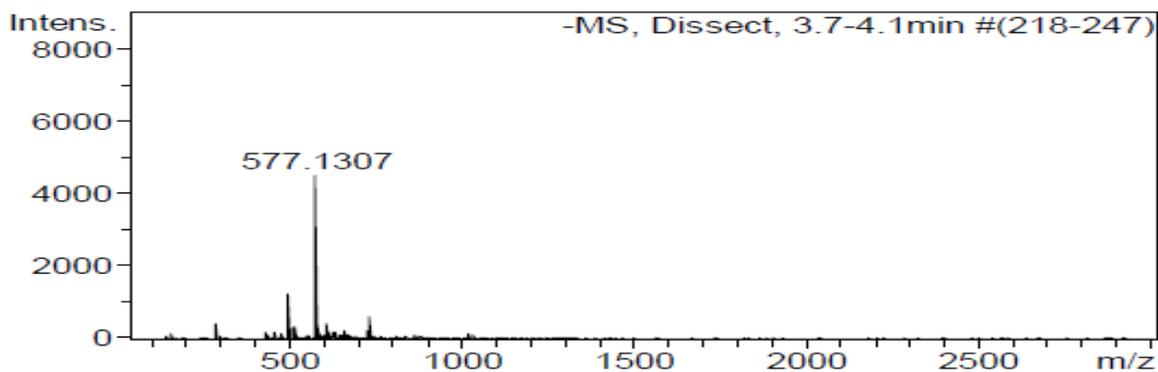
#	m/z	I
1	153.0168	2253
2	289.0704	85823
3	290.0731	14176
4	291.0743	2309
5	325.0457	2173
6	579.1489	40790
7	580.1517	15140
8	581.1534	3836
9	869.2227	1888
10	1186.2591	1344

Cmpd 13, Dissect, 3.7 min



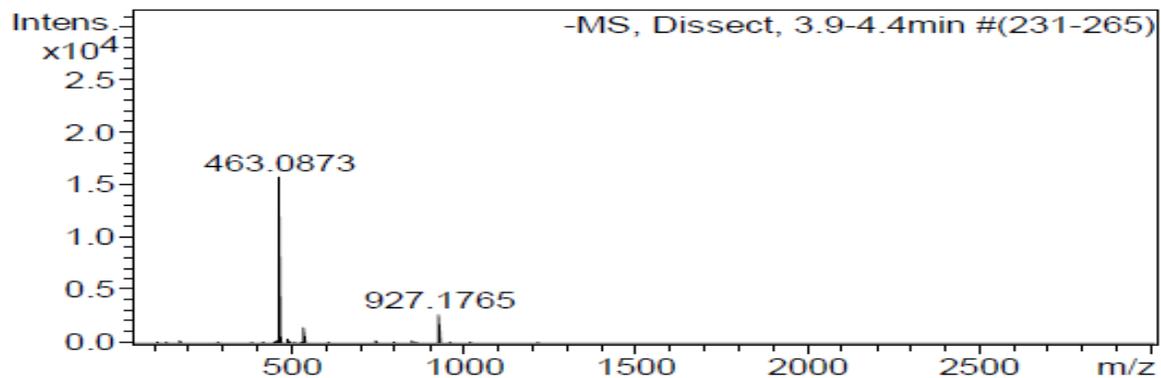
#	m/z	I
1	287.0536	1144
2	289.0702	23791
3	290.0731	4268
4	325.0447	770
5	357.0574	949
6	451.1225	1530
7	453.1031	910
8	579.1484	4167
9	580.1515	1432
10	729.1448	1404

Cmpd 14, Dissect, 3.8 min



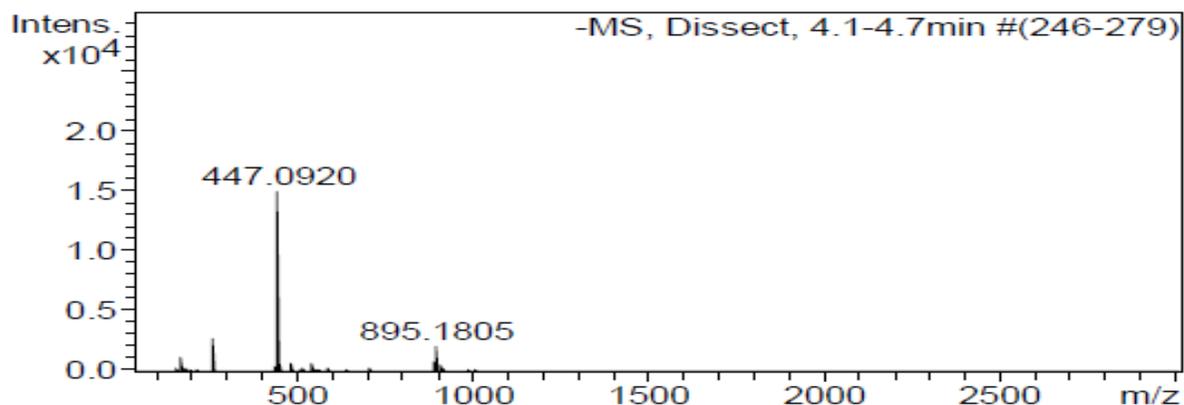
#	m/z	I
1	287.0535	426
2	497.1059	1253
3	498.1106	316
4	508.1043	303
5	515.0944	358
6	577.1307	4513
7	578.1352	1571
8	579.1410	432
9	605.1116	437
10	729.1438	645

Cmpd 15, Dissect, 4.0 min



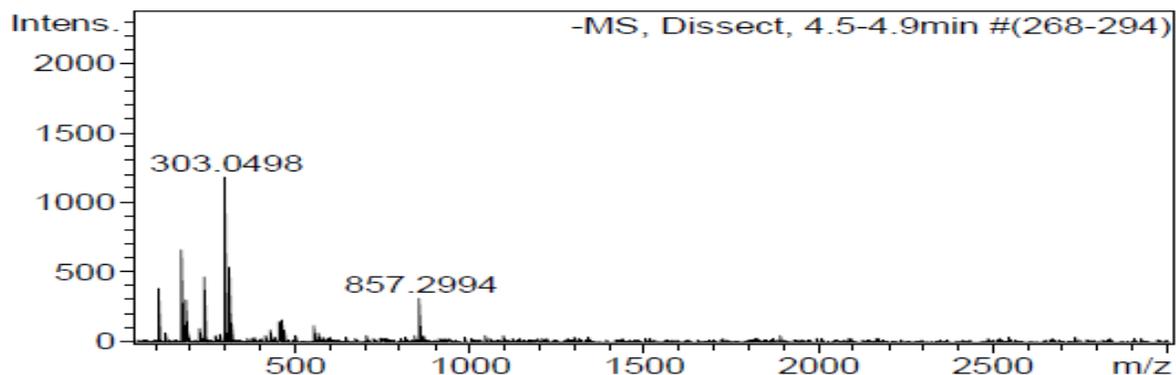
#	m/z	I
1	463.0873	15733
2	464.0912	4107
3	465.0957	877
4	491.1896	410
5	537.1945	1474
6	538.1972	402
7	925.1580	351
8	927.1765	2747
9	928.1786	1328
10	929.1798	494

Cmpd 18, Dissect, 4.2 min



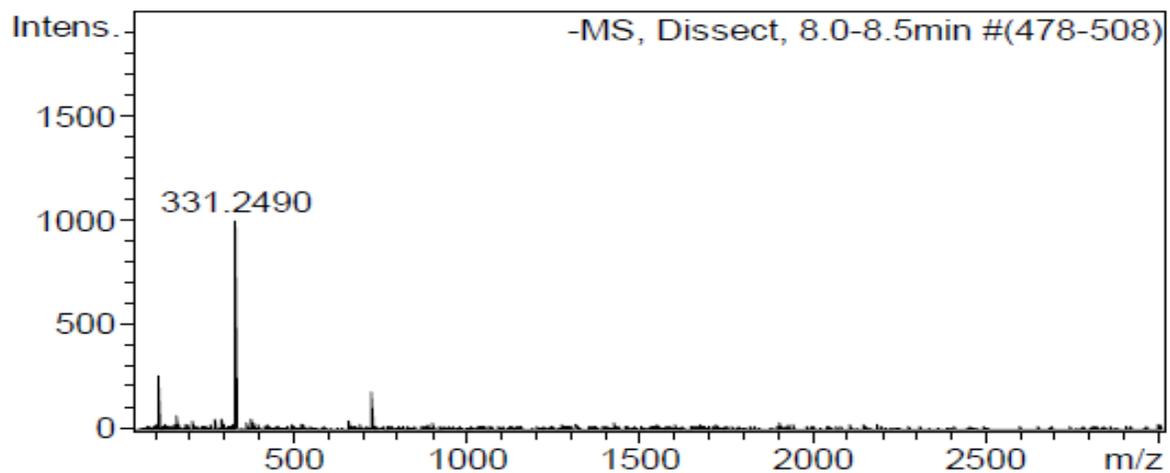
#	m/z	I
1	173.0799	1197
2	261.1326	2753
3	447.0920	14958
4	448.0951	3251
5	449.0981	672
6	483.0723	667
7	541.1345	601
8	889.1756	757
9	895.1805	2102
10	896.1812	1253

Cmpd 21, Dissect, 4.6 min



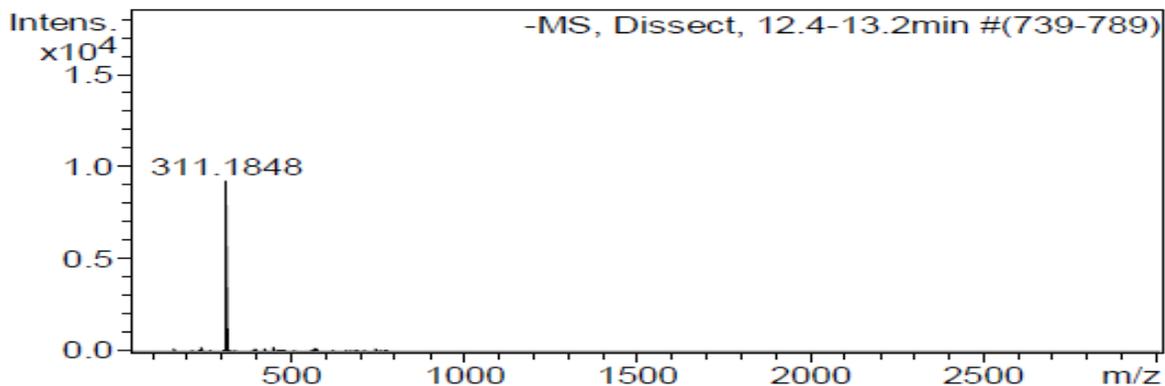
#	m/z	I
1	112.9827	389
2	175.0951	667
3	193.0488	305
4	243.1206	468
5	303.0498	1183
6	304.0510	301
7	317.0608	537
8	461.1040	149
9	463.0853	163
10	857.2994	315

Cmpd 37, Dissect, 8.2 min



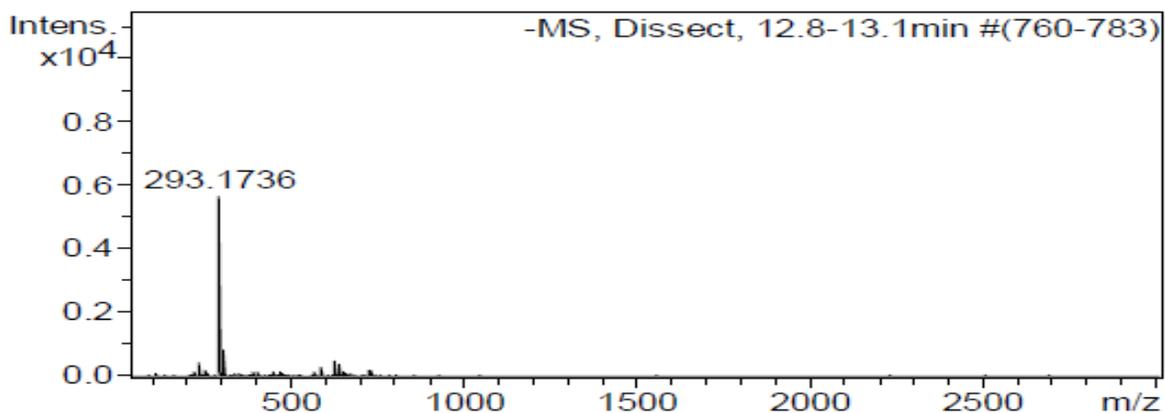
#	m/z	I
1	112.9825	261
2	331.2490	999
3	332.2499	212
4	723.5045	181
5	724.5049	157

Cmpd 57, Dissect, 12.5 min



#	m/z	I
1	165.0371	193
2	241.1499	224
3	311.1848	9213
4	312.1885	2105
5	397.2041	127
6	425.1877	190
7	449.3101	210
8	571.2962	170
9	572.2959	170
10	743.4501	134

Cmpd 59, Dissect, 12.9 min



#	m/z	I
1	236.1036	435
2	293.1736	5680
3	294.1763	840
4	309.1718	852
5	310.1762	282
6	587.3204	324
7	625.4466	491
8	626.4507	245
9	639.4263	364
10	641.4439	394

ANEXO B

Productos derivados de este trabajo de investigación:

Hindawi Publishing Corporation
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2016, Article ID 4032618, 7 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/4032618>



Research Article

Evaluation of Hypoglycemic and Genotoxic Effect of Polyphenolic Bark Extract from *Quercus sideroxyla*

Marcela Soto-García,¹ Martha Rosales-Castro,¹
Gerardo N. Escalona-Cardoso,² and Norma Paniagua-Castro²

¹CIIDIR-Unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional, Sigma 119 Fraccionamiento 20 de Noviembre, 34220 Durango, DGO, Mexico

²Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Wilfrido Massieu s/n, Esquina Manuel L. Stampa, Colonia Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Delegación Gustavo A. Madero, 07738 Ciudad de México, Mexico

Correspondence should be addressed to Norma Paniagua-Castro; npaniag@hotmail.com

Received 20 May 2016; Revised 9 September 2016; Accepted 4 October 2016

Academic Editor: Hilal Zaid

Copyright © 2016 Marcela Soto-García et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Quercus sideroxyla is a wood species whose bark has phenolic compound and should be considered to be bioactive; the hypoglycemic and genotoxic properties of *Q. sideroxyla* bark were evaluated in this study. Total phenolic compound was determined in crude extract (CE) and organic extract (OE). The OE has the highest amount of phenols (724.1 ± 12.0 GAE/g). Besides, both CE and OE demonstrated effect over the inhibition of α -amylase *in vitro*. Hypoglycemic activity was assessed by glucose tolerance curve and the area under curve (UAC); OE showed the highest hypoglycemic activity. In addition, diabetes was induced by streptozotocin (65 mg/kg) and the extracts (50 mg/kg) were administered for 10 days; OE showed hypoglycemic effect compared with diabetic control and decreased hepatic lipid peroxidation. Acute toxicity and genotoxicity were evaluated in CE; results of acute toxicity did not show any mortality. Besides, the comet assay showed that CE at a dose of 100 mg/kg did not show any genotoxic effect when evaluated at 24 h, whereas it induced slight damage at 200 mg/kg, with the formation of type I comets.

1. Introduction

Quercus species have been used in Mexican traditional medicine [1]; specifically *Q. sideroxyla* has antioxidant compounds present in leaves [2] which decrease the levels of inflammatory markers such as COX-2 and IL-8 by modulating the expression of NF-kB [3]. Ten different polyphenols had been reported in the bark of this species [4], which are bioactive phytochemicals [5], found in green tea and found to possess hypoglycemic properties [6, 7].

Polyphenols are the most abundant dietary antioxidants and are common constituents of many plant food sources, including fruits, vegetables, seeds, chocolate, wine, coffee, and tea; thus they have acquired significant interest [8].

Recent studies have shown promising results for these compounds in various pathological conditions such as

diabetes, cancer, atherosclerosis, cardiovascular, and neurological disorders [9–11].

The efficacy of polyphenols on carbohydrate metabolism and glucose homeostasis has been investigated *in vitro*, in animal models and clinical trials [12]. The polyphenols regulate the postprandial hyperglycemia through inhibiting carbohydrate-hydrolyzing enzymes such as alpha-amylase and alpha-glucosidase [13].

The origin of these bioactive compounds makes them safe for human consumption; however, some investigations reported toxic effects caused by plants [14–16]. Therefore, it is important to carry out toxicological and genotoxic assays [17], to assess the risk/benefit of its therapeutic use in humans.

Therefore, the aim of this research was to evaluate the hypoglycemic and genotoxic properties of polyphenolic extracts from *Q. sideroxyla* bark in a diabetic murine model.

EFECTO DEL SOLVENTE Y DE LA RELACIÓN MASA/SOLVENTE, SOBRE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE CORTEZA DE *Pinus durangensis* Y *Quercus sideroxyla*

EFFECT OF SOLVENT AND SOLVENT-TO-SOLID RATIO ON THE PHENOLIC EXTRACTION AND THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF EXTRACTS FROM *Pinus durangensis* AND *Quercus sideroxyla* BARK

Marcela Soto-García¹, Martha Rosales-Castro^{1,*}

RESUMEN

En la búsqueda de compuestos bioactivos de las plantas, la corteza de especies maderables es un subproducto promisorio, ya que contiene compuestos fenólicos de interés terapéutico. La extracción de estos metabolitos depende del disolvente que se utilice y de variables aplicadas en el proceso. Para un fin terapéutico, la medicina tradicional utiliza únicamente mezclas de etanol y agua. Se realizaron extracciones de la corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxyla*, bajo un diseño experimental 2x3x3 para estudiar el efecto de soluciones hidroetanólicas 20, 50 y 80%, y la relación masa a extraer/volumen de disolvente 1/10, 1/20 y 1/30 sobre el rendimiento en sólidos, donde 28,72 ±0,9% correspondió a *Pinus durangensis* (PdE50-1/20) y 24,95±1,2% para *Quercus sideroxyla* (QsE50-1/30), la máxima concentración de fenoles totales se obtuvo con etanol 80%- 1/10 en ambas especies (PdE80-1/10 con 712,36±13,4 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g) y QsE80-1/10 de 592,97±10,6 (GAE/g), mientras que la capacidad antioxidante evaluada mediante las técnicas de DPPH, ABTS y FRAP, mostró que PdE20-1/30 y QsE50-1/10, tuvieron la mayor actividad. Se encontraron diferencias estadísticas (p<0,05) entre los tratamientos aplicados.

La concentración de etanol tuvo mayor efecto que la relación masa/volumen de extracción. *Pinus durangensis* contiene mayor concentración de fenoles y de flavonoides, respecto a *Quercus sideroxyla*, mientras que la cantidad de proantocianidinas es similar en ambas especies. Los flavonoides de *Pinus durangensis* son principalmente de tipo flavanona y flavonol, mientras que *Quercus sideroxyla* contiene ácido gálico y flavan-3-ol (catequinas).

Palabras clave: Compuestos bioactivos, corteza, fenoles, flavonoides, proantocianidina.

ABSTRACT

Bark from timber species might be a promising target of therapeutical interest due to its content of bioactive, phenolic compounds. However, the extraction efficiency of these metabolites depends on the type of solvent chosen and the process variables analyzed. Traditional medicine only uses ethanol and water mixtures for therapeutical purposes. Therefore, in this study extractions of *Pinus durangensis* and *Quercus sideroxyla* bark were realized. In order to study the effect of the hydroethanolic solutions of 20, 50 and 80% and the relation mass/solvent volume ratio of 1/10, 1/20 and 1/30, an experiment design of 2x3x3 was followed, over the extract yield; where 28,72 ±0,9% corresponded to *P. durangensis*

¹Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Durango, Durango, México.

*Corresponding author: mrciidirdgo@yahoo.com

Received: 06.11.2015 Accepted: 09.08.2016

Cytotoxic activity of bark extracts from Pinaceae *Pinus durangensis* Martinez and Fagaceae *Quercus sideroxyla* Bonpl. on breast cancer, cervix cancer and Fibroblast H1184 cell lines.

Marcela Soto-García,¹ Martha Rosales-Castro,¹ José R. García-Sánchez,² María J. Rivas-Arreola³

¹Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR- Unidad Durango, Sigma 119 Fraccionamiento 20 de Noviembre, 34220 Durango, DGO, México.

² Instituto Politécnico Nacional, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del, Plan de San Luis y Diaz Mirón s/n, Col. Casto de Santo Tomas, Delegación Miguel Hidalgo, C.P. 113340, Ciudad de México, México.

³ Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Zapopan, México.

Correspondence should be addressed to: mciidirdgo@yahoo.com

Abstract.

Nowadays the bioactive compounds (polyphenols) of from plants represents a great potential for discovering novel drug that could act in cancer treatment. Phenolic perfil and cytotoxic activitites of crude and organic extracts from *P. durangensis* and *Q. sideroxyla* bark, were evaluated. Some compound like taxifolin and procyanidin dimers, were compounds identificados in extracts of both species by ESI-MS. The cytotoxic activities was showed against MDA-MB-231(breast cancer), HeLa (cervix cancer), MCF-10A (breast non-tumorous cell) and HSF-1184 (human skin fibroblast cells) by MTT (0-200 µg/mL). All extracts showed a phenolic dose-dependent cytotoxic effect against cancer cell lines and small or no activity against non-tumorous.

Keyword: bark extracts, cancer cell lines, cytotoxic, *P. durangensis*, *Q. sideroxyla*,

Soto-García, M., Rosales-Castro, M., Escalona-Cardoso, G. N., & Paniagua-Castro, N. (2016). Evaluation of Hypoglycemic and Genotoxic Effect of Polyphenolic Bark Extract from *Quercus sideroxylla*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.

Soto-García, M., & Rosales-Castro, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas. Ciencia y tecnología*. DOI: 10.4067/S0718-221X2016005000061

Soto-García, M., Rosales-Castro, M., García-Sánchez, J.R., Rivas-Arreola, M.J. (2017). Cytotoxic activity of bark extracts from *Pinaceae Pinus durangensis* Martínez and *Fagaceae Quercus sideroxylla* Bonpl. on breast cancer, cervix cancer and Fibroblast H1184 cell lines. (En revision).

Artículos in extenso en Memorias de Congreso

Marcela Soto García, Martha Rosales Castro, Norma Paniagua Castro “Efecto de extractos polifenólicos de corteza de *P. durangensis* y *Q. Sideroxylla* sobre peroxidación lipídica evaluada en modelo murino.” XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ, Puerto Vallarta, Jalisco, México, 3-6 de mayo 2016. ISBN 978-607-95593-4-2

Presentación del trabajo doctoral en congresos nacionales/ internacionales:

2017 Congreso de Ingeniería de Industrias Alimentarias: “Evaluación y aplicación nutracéutica de extractos de origen vegetal”, Río Grande Zacatecas.

2016 XXXVII Encuentro Nacional Amidiq: Efecto de corteza de *P. durangensis* y *Q. sideroxylla* sobre peroxidación lipídica evaluado en modelo murino, Puerto Vallarta, Jalisco,

2014 1ST Biotechnology world symposium: “Extraction of polyphenols from *Pinus durangensis* and *Quercus sideroxylla* bark applying a factorial design” Tlaxcala, México.

***Estancia de Investigación**

Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey campus Guadalajara. Departamento Ciencias de la Salud y biotecnología. Dra. María José Rivas Arreola. 2017

Escuela superior de medicina- unidad de posgrado – Instituto Politécnico Nacional. Dr. Rubén García Sánchez. 2016

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Departamento de fisiología. Dra. Norma Paniagua Castro. 2015.