



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

"Evaluación de la toxicidad oral aguda y el efecto hepatoprotector de una bebida funcional a base de hojas de *Ilex guayusa* (Loes), *Vernonanthura patens* (Kunth) y cascarilla de cacao en modelo murino"

Trabajo de titulación Previo a la obtención del Título de Magister en Biociencias Aplicadas con Mención en Biodescubrimiento

Presentado por: Geovanna Lissette Paladines Santacruz

Guayaquil – Ecuador, 2022

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo fue auspiciado por la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) mediante financiamiento de la Red Ecuatoriana de Universidades y Escuelas Politécnicas para el Desarrollo de la Investigación y el Posgrado/ REDU (No. PREDU-2016-002). Además, esta investigación recibió el apoyo de la RED VLIR NETWORK ECUADOR como parte de un acuerdo interinstitucional. Agradezco al Dr. Juan Manuel Cevallos, por su excelente guía durante el transcurso del posgrado. Agradezco a la Dra. Andrea Orellana, Dr. Fausto Zaruma, Dra. Patricia Manzano, Dra. Johana Ortiz y Dr. Omar Ruiz por su apoyo para lograr la culminación exitosa de mi maestría. Agradezco al Laboratorio para Investigaciones Biomédicas de la ESPOL y al CIBE por el apoyo en la ejecución del proyecto. Agradezco también, a la Universidad de Guayaquil y a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por la colaboración para la ejecución de los ensayos experimentales.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis amados padres, William y Angelita, quienes me han brindado su apoyo y comprensión durante todas las etapas de mi vida y por su amor incondicional. A mis hermanos queridos, William y Bryan, mis abuelitos, Grace, Pepito, Aida y José, a mis tíos/as, Alexandra, Jacqueline y Alex, y mis primos/as, quienes me ayudaron con sus palabras de motivación para esforzarme día a día para culminar mi objetivo. A mis sobrinitos Willito, Benji y Elian que los amo mucho. A mi compañero y enamorado, Jhon, por tu cariño y apoyo durante este tiempo. A mi amiga Mayra por su amistad verdadera.

Quiero enfatizar la dedicatoria a mis seres queridos que ya no están en esta tierra, pero día a día los tengo presentes en mi mente y corazón: mi abuelito José, mi abuelito Don Pepito, mi tía Elenita y mi tío Fabian.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Julia Ruth Nieto Wigby, Ph.D.
Presidenta

Andrea Orellana Manzano, Ph.D.
Tutor

Fausto Zaruma Torres, Ph.D.
Cotutor

Patricia Manzano Santana, Ph.D.
Evaluator

Johana Ortiz Ulloa, Ph.D.
Evaluator

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral".



Firmado electrónicamente por:
**GEOVANNA LISSETTE
PALADINES
SANTACRUZ**

Q.F. Geovanna Lissette Paladines Santacruz

RESUMEN

En vista de la creciente demanda de alimentos que ayuden a la prevención y tratamiento de diversas afecciones de la salud, se ha incentivado el desarrollo de productos naturales a base de hierbas medicinales ricos en compuestos bioactivos con potenciales efectos terapéuticos. Sin embargo, se sabe que la interacción entre los componentes de los extractos herbales puede tener efectos nocivos sobre la salud humana en la dosis inadecuada, por lo que es necesario que se realicen estudios toxicológicos como requisito para prevenir la toxicidad y determinar un rango de dosis segura para el consumo humano. En un estudio previo se desarrolló una bebida funcional (BF) a base de hojas de *Ilex guayusa*, *Vernonathura patens* y cascarilla de cacao, la cual presentó un alto contenido de compuestos fenólicos y buena capacidad antioxidante, que podría resultar beneficiosa para el tratamiento de diversas patologías. Por otro lado, las enfermedades hepáticas son consideradas como un grave problema de salud a nivel mundial, y con frecuencia son causadas por el abuso de drogas farmacéuticas, como el paracetamol (PAT), que genera lesiones en el hígado conduciendo a un daño hepático agudo. Cabe mencionar que una dieta rica en antioxidantes podría ayudar a atenuar los daños causados por medicamentos ya que actúan combatiendo el estrés oxidativo generado en el organismo. Por lo anterior expuesto, se planteó como objetivo establecer la toxicidad de la BF y evaluar su efecto farmacológico como hepatoprotector. Para esto se llevó a cabo un ensayo de toxicidad oral aguda de dos formulaciones (pre-formulado y microencapsulado) de la BF a la dosis única de 2000 mg/kg de peso corporal (p.c.) en ratones albinos machos y las evaluaciones consistieron en el análisis anatómico e histopatológico, control de peso corporal y observación de patrones de comportamiento. Para la evaluación del efecto hepatoprotector se analizó la eficacia terapéutica de las dos formulaciones a 3 dosis de concentración (250, 500 y 1000 mg/kg), administrados vía oral como tratamiento preventivo en ratones inducidos a lesión hepática con PAT. La eficacia terapéutica se determinó mediante el análisis de los biomarcadores hepáticos, aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), y análisis anatómico e histopatológico. En los resultados del estudio toxicológico, no se observaron signos de toxicidad o muerte. Tampoco se observaron cambios significativos en el peso corporal y de órganos, ni cambios histopatológicos en los órganos evaluados. Por otro lado, en el estudio hepatoprotector, los resultados indicaron que el pre-tratamiento con el pre-formulado ayudó a atenuar de manera significativa los daños ocasionados por el PAT en el hígado. Se concluyó que la BF es inocua para la salud humana a la dosis de 2000 mg/kg y además presenta potenciales efectos como protector hepático.

ABSTRACT

In view of the growing demand for foods that help prevent and treat various health conditions, the development of herbal natural products, rich in bioactive compounds with potential therapeutic effects, has been encouraged. However, it is known that the interaction between the components of herbal extracts can have harmful effects on human health when administered in the wrong dose. Thus, it is necessary to carry out toxicological studies in order to prevent toxicity and determine a safe dose range for human consumption. In a previous study, a functional beverage (BF) was elaborated from leaves of *Ilex guayusa*, *Vernonathura patens* and cocoa husk, which presented a high content of phenolic compounds and good antioxidant capacity that could be beneficial for the treatment of various pathologies. On the other hand, liver diseases are considered a serious health problem worldwide, which are often caused by the abuse of pharmaceutical drugs, such as paracetamol (PAT), known for producing hepatic injury that leads to acute liver failure. In this context, it is noteworthy that a diet rich in antioxidants could help mitigate the damage caused by medications as these molecules act by combating the oxidative stress generated in the human body. Therefore, the aim of this study was to establish the toxicity of the BF and evaluate its pharmacological effect as a hepatoprotective product. To accomplish this, an acute oral toxicity test of two formulations (pre-formulated and microencapsulated) of BF was carried out at a single dose of 2000 mg/kg of body weight (bw) in male albino mice. The evaluations carried out were: an anatomical and histopathological analysis, a body weight control and an observation of behavior patterns. For the evaluation of the hepatoprotective effect, the therapeutic efficacy of the two formulations was analyzed using 3 concentration doses (250, 500 and 1000 mg/kg), administered orally as a preventive treatment in mice with PAT-induced liver injury. Therapeutic efficacy was determined by analysis of liver biomarkers, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), and the anatomical and histopathological analysis. The results of the toxicological study showed no signs of toxicity or death. Also, no significant changes in body and organ weights were observed, and the organs evaluated had no histopathological changes. Moreover, in the hepatoprotective study, the results indicated that pre-treatment with the pre-formulated helped to significantly attenuate the damage caused by PAT in the liver. In summary, the BF is harmless to human health at a dose of 2000 mg/kg and it present potential effects as a liver protector.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
AGRADECIMIENTO	II
DEDICATORIA	III
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN	IV
DECLARACIÓN EXPRESA.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT	VII
ÍNDICE GENERAL	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
ABREVIATURAS.....	XIII
SIMBOLOGÍA	XV
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
<i>1.1. Antecedentes y Justificación</i>	<i>1</i>
<i>1.2. Objetivo General</i>	<i>4</i>
<i>1.3. Objetivos Específicos</i>	<i>4</i>
CAPÍTULO 2.....	5
MARCO TEÓRICO	5

2.1.	<i>Ilex guayusa (Loes)</i>	5
2.2.	<i>Vernonanthura patens (Kunth) H. Rob.</i>	5
2.3.	<i>Theobroma cacao L.</i>	6
2.4.	<i>Bebidas funcionales</i>	6
2.5.	<i>Estrés oxidativo y Antioxidantes</i>	7
2.6.	<i>Estudios toxicológicos</i>	7
2.7.	<i>Hígado y enfermedades hepáticas</i>	8
CAPÍTULO 3.....		9
METODOLOGÍA		9
3.1.	<i>Material vegetal</i>	10
3.2.	<i>Animales de experimentación</i>	10
3.3.	<i>Reactivos y equipos</i>	11
3.4.	<i>Preparación de la muestra de la BF</i>	11
3.5.	<i>Estudio de toxicidad oral aguda</i>	12
3.5.1.	Diseño experimental	12
3.5.2.	Evaluaciones toxicológicas.....	12
3.5.3.	Análisis anatomopatológico.....	13
3.6.	<i>Estudio hepatoprotector</i>	15
3.6.1.	Diseño experimental.....	15
3.6.2.	Análisis del perfil hepático.....	16
3.6.3.	Análisis anatomopatológico.....	16
CAPÍTULO 4.....		19

RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	19
4.1. <i>Estudio de toxicidad oral aguda</i>	19
4.1.1. Peso corporal, y consumo de alimento y agua	19
4.1.2. Observaciones macroscópicas, peso relativo de órganos y análisis histopatológico	21
4.2. <i>Estudio hepatoprotector</i>	24
4.2.1. Observación macroscópica, peso relativo e histopatología de los hígados	24
4.2.2. Efecto de la BF sobre los niveles serológicos de las enzimas hepáticas ALT y AST.....	29
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35
ANEXOS	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema general del estudio	9
Figura 2. Esquema del estudio de toxicidad oral aguda.....	14
Figura 3. Esquema del estudio hepatoprotector	17
Figura 4. Visualización macroscópica del corazón (A, B y C), hígado (D, E y F), estómago (G, H e I), y riñones (J, K y L) de los grupos tratados con el pre-formulado y el microencapsulado de la BF a la dosis única oral de 2000 mg/kg, y el grupo control.....	21
Figura 5. Microfotografías de cortes histológicos de los órganos embebidos en parafina y teñidos con hematoxilina/eosina (40X). Hígado (A, B y C), riñones (D, E y F) y estómago (G, H e I) de los grupos tratados con el pre-formulado y microencapsulado de la BF a una dosis única oral de 2000 mg/kg, y el grupo control.	23
Figura 6. Visualización macroscópica de los hígados. Grupo I (control normal), grupo II (modelo tóxico, paracetamol 250 mg/kg), grupo III (silimarina 200 mg/kg) + PAT, grupo IV (pre-formulado 250 mg/kg) + PAT, grupo V (pre-formulado 500 mg/kg) + PAT, grupo VI (pre-formulado 1000 mg/kg) + PAT, grupo VII (microencapsulado 250 mg/kg) + PAT, grupo VIII (microencapsulado 500 mg/kg) + PAT, grupo IX (microencapsulado 1000 mg/kg) + PAT.	25
Figura 7. Microfotografías de cortes histológicos de los hígados embebidos en parafina y teñidos con hematoxilina/eosina (40X). Grupo I (control normal), grupo II (modelo tóxico, paracetamol 250 mg/kg), grupo III (silimarina 200 mg/kg) + PAT, grupo IV (pre-formulado 250 mg/kg) + PAT, grupo V (pre-formulado 500 mg/kg) + PAT, grupo VI (pre-formulado 1000 mg/kg) + PAT, grupo VII (microencapsulado 250 mg/kg) + PAT, grupo VIII (microencapsulado 500 mg/kg) + PAT, grupo IX (microencapsulado 1000 mg/kg) + PAT.....	28
Figura 8. Efecto de los tratamientos de la BF sobre los niveles séricos de AST (A) y ALT (B). media \pm DE (n=4). I (CONTROL, control normal), grupo II (PAT, modelo tóxico, paracetamol 250 mg/kg), grupo IV (PRE 250, pre-formulado 250 mg/kg) + PAT, grupo V (PRE 500, pre-formulado 500 mg/kg) + PAT, grupo VI (PRE 1000, pre-formulado 1000 mg/kg) + PAT, grupo VII (MICRO 250, microencapsulado 250 mg/kg) + PAT, grupo VIII (MICRO 500, microencapsulado 500 mg/kg) + PAT, grupo IX (MICRO 1000, microencapsulado 1000 mg/kg) + PAT.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla I. Peso corporal, consumo de alimento y agua de los grupos tratados con la BF y el grupo control. Valores expresados como la media \pm DE.....	20
Tabla II. Peso relativo de los órganos de los grupos tratados con la BF y el grupo control. Valores expresados como la media \pm DE, n=5.....	22
Tabla III. Peso relativo de los hígados de los grupos experimentales del estudio hepatoprotector. Valores expresados como la media \pm DE, n=4	26

ABREVIATURAS

AINES	Medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (por sus siglas en inglés)
AST	Aspartato aminotransferasa
ALT	Alanina aminotransferasa
ALP	Fosfatasa alcalina
ANOVA	Análisis de varianza
BF	Bebida funcional
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
CAT	Catalasa
DE	Desviación estándar
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
ESPE	Escuela Politécnica del ejército
FICMP	Facultad de Ingeniería Mecánicas y Ciencias de la Producción
GSH	Glutación
GGT	Gamma-glutamyl-transferasa
INSPI	Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública
I.P.	Intraperitoneal
IL-10	Interleucina 10
MCCH	Maquita Cushunchic

MAE	Ministerio del Ambiente
NAPQI	N-acetil-p-benzoquinonaimina
OMS	Organización Mundial de la Salud
OCDE	Organización para Cooperación y Desarrollo Económico
PAT	Paracetamol
P.C.	Peso corporal
PBS	Buffer fosfato salino (por sus siglas en inglés)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés)
SOD	Superóxido dismutasa
V.O.	Vía oral

SIMBOLOGÍA

°C	Grado centígrado
g	gramo
h	hora
kg	kilogramo
L	litro
min	minutos
mL	mililitro
mg	miligramo
pH	Potencial de hidrógeno
r.p.m.	Revoluciones por minuto
µg	microgramo
µL	microlitro
%	porcentaje

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Antecedentes y Justificación

En la actualidad existe una creciente demanda de alimentos que además de satisfacer las necesidades nutricionales de la población, ayuden al tratamiento y la prevención de enfermedades de salud (Derkyi et al., 2018; Nystrand & Olsen, 2019). El desarrollo de alimentos funcionales puede cubrir esta demanda pues contienen elementos naturales con compuestos bioactivos de potencial actividad farmacológica (Segura-Badilla et al., 2020).

Debido a que en Ecuador existe una amplia variedad de plantas con alto valor nutricional y medicinal (Derkyi et al., 2018), es común que la medicina herbal sea utilizada como el primer recurso para el tratamiento de problemas de salud (Caballero-Serrano et al., 2019; Rosales-Rivadeneira et al., 2017). De hecho, la OMS menciona que, en los países en desarrollo el 80% de la población depende de los medicamentos derivados de las plantas para la atención de la salud (World Health Organization, 2019). A pesar de que la medicina ancestral ha sido utilizada durante siglos hasta el día de hoy (Saleem et al., 2017) y además de ser catalogada como inocua por su uso a largo plazo, esta podría llegar a ser perjudicial para la salud humana en las dosis incorrectas (Shin et al., 2020). Por este motivo es necesario que se lleve a cabo estudios toxicológicos como un requisito absoluto para prevenir la toxicidad adversa y determinar un rango de dosis segura para el consumo (Shin et al., 2020).

Por otra parte, las enfermedades hepáticas son consideradas como un grave problema de salud pública, las cuales pueden ser inducidas por ciertos factores como los malos hábitos alimenticios, el consumo de bebidas alcohólicas, el abuso de medicamentos y entre otras causas (Elufioye & Habtemariam, 2019; Ren et al., 2019). Así pues, la automedicación es considerada una de las causas más importantes de reacciones adversas y se ha determinado que en el Ecuador aproximadamente el 55% de la población recurre a la automedicación (Orellana-Manzano et al., 2021).

Es conocido que los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son utilizados ampliamente como analgésicos y antipiréticos de uso común (González-Ponce et al., 2016). El PAT (N-acetil-p-aminofenol) es un medicamento de venta libre cuyo exceso de dosis y/o frecuencia de administración causada por la automedicación podría causar graves lesiones hepáticas. A dosis terapéutica, PAT se metaboliza a la especie reactiva N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI) que es transformada en un compuesto inofensivo por enzimas del organismo como el glutatión (GSH) (Jin et al., 2021). Cuando existe una sobredosis de PAT se genera un desequilibrio donde el NAPQI supera el nivel de GSH y se une a proteínas mitocondriales de los hepatocitos, causando estrés oxidativo que resulta en daño de ADN mitocondrial, daño de la integridad de la membrana, fragmentación del ADN y muerte celular (Chen et al., 2020).

Ahora bien, se conoce que una dieta rica en antioxidantes puede ayudar a prevenir daños del hígado causado por medicamentos, puesto que estos agentes actúan inactivando las ROS del proceso oxidativo generado en el organismo y reforzando el sistema inmunológico (Sangronis et al., 2014). En particular, la silimarina es un fármaco conocido como hepatoprotector pues gracias a su combinación de compuestos fenólicos ayuda al tratamiento eficaz de las enfermedades hepáticas (Dogaru et al., 2020). Pero debido a la escasez de fármacos hepatoprotectores, se han llevado a cabo numerosos estudios para evaluar la eficacia farmacológica de productos naturales como otras alternativas terapéuticas para el cuidado del hígado (Kalantari et al., 2019; Lee et al., 2018).

En un estudio previo, nuestro grupo de investigación desarrolló la fórmula de una BF a base de extracto acuoso de hojas *I. guayusa*, *Vernonanthura patens*, y cascarilla de cacao (11591SECRETOCIBE), la cual presentó altas cantidades de compuestos fenólicos como los ácidos clorogénicos, la quercetina y el ácido cafeico con buena capacidad antioxidante. Además, se reportó un alto contenido de alcaloides como la cafeína y la teobromina. Estos hallazgos le otorgaron potenciales beneficios para la salud humana, por ejemplo, la prevención de enfermedades asociadas al síndrome metabólico (Quijano-Avilés, 2019).

La guayusa (*Ilex guayusa*) es una planta cuyas hojas suelen ser consumidas como una infusión por sus propiedades energéticas y beneficios curativos (Arteaga-Crespo et al., 2020) en las cuales se han identificado compuestos fenólicos como los ácidos clorogénicos y quercetina; y alcaloides como la cafeína y la teobromina, y juntos, estos metabolitos proporcionan actividades antioxidantes, antiinflamatorias y estimulantes (Manzano Santana et al., 2018; Gan et al., 2018). Por otro lado, en las hojas del laritaco (*Vernonanthura patens*) se han encontrado compuestos fenólicos y triterpenoides pentacíclicos, y la decocción de las hojas es consumida tradicionalmente como antipirético, antiinflamatorio y para el tratamiento del cáncer y la leishmaniasis (Chóez-Guaranda et al., 2018; Chóez-Guaranda et al., 2019; Manzano et al., 2015). En cuanto a la cascarilla de cacao (*Theobroma cacao*), esta presenta un alto valor nutricional, y es rica en compuestos fenólicos y alcaloides, como teobromina y cafeína, que le aportan propiedades antioxidantes y estimulantes (Rojo-Poveda et al., 2020). Además, se ha demostrado que el cacao posee propiedades hepatoprotectoras (Aidoo et al., 2012).

Por último, es conveniente acotar que mediante el consumo de la combinación de estos productos vegetales (guayusa, laritaco y cacao) en forma de una infusión, se puede lograr potenciar sus propiedades y obtener mayores beneficios terapéuticos. Por lo tanto, para descartar la posible toxicidad adversa de esta BF es necesario que se lleven a cabo estudios que demuestren su inocuidad para la salud humana y además resulta de interés evaluar su beneficio terapéutico como protector hepático mediante ensayos farmacológicos *in vivo*.

1.2. Objetivo General

Evaluar la toxicidad oral aguda y el efecto hepatoprotector de una bebida funcional a base de hojas de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y cascarilla de cacao mediante ensayos *in vivo*.

1.3. Objetivos Específicos

Establecer la toxicidad oral aguda de la bebida funcional mediante el método de la dosis fija No. 420 (OCDE) en ratones experimentales.

Analizar el efecto hepatoprotector de la bebida funcional mediante el modelo de inducción a daño hepático con paracetamol en ratones experimentales.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1. *Ilex guayusa* (Loes)

Ilex guayusa es un árbol nativo de la Amazonía que pertenece a la familia *Aquifoliaceae* (Manzano Santana et al., 2018) y se encuentra distribuida en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano (Radice et al., 2017). En Ecuador, se puede encontrar en las provincias de Sucumbíos, Napo, Pastaza, Morona Santiago, Zamora Chinchipe y Pichincha (Manzano Santana et al., 2018). En el extracto acuoso de sus hojas se han reportado metabolitos secundarios como triterpenoides pentacíclicos, xantinas, flavonoides, compuestos fenólicos y alcaloides. Además, presenta un alto contenido de polifenoles como el ácido clorogénico, catequina, epicatequinas y quercetina-3-O-hexosa con actividad antioxidante y antiinflamatoria (Gan et al., 2018). También, contiene cafeína y teobromina, con propiedades estimulantes y antioxidantes (Manzano Santana et al., 2018). En la medicina etnobotánica es conocida por su capacidad estimulante por lo cual es utilizada por las etnias indígenas en los rituales (Gan et al., 2018).

Por otro lado, es empleado como diurético, digestivo, antigripal, hipoglucemiante y desinflamante. También se usa para el tratamiento del asma y expectorante (Chóez-Guaranda et al., 2021). Otros atributos medicinales incluyen en ayudar a la cicatrización y para tratar el reumatismo. Igualmente, ayuda a combatir la obesidad, regular la presión arterial y como hipoglucemiante (Gan et al., 2018).

2.2. *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob.

Vernonanthura patens es un arbusto originario de Sudamérica y México, que pertenece a la familia *Asteraceae* y se encuentra distribuida en bosques secos y húmedos (Manzano Santana et al., 2013). En Ecuador es conocido comúnmente como laritaco y crece de manera silvestre en algunas provincias como El Oro, Loja, Los Ríos, Manabí y Guayas (Chóez-Guaranda, 2018; Manzano et al., 2014). Se encuentra compuesto químicamente de triterpenoides pentacíclicos como el lupeol y epilupeol que han demostrado actividad

antifúngica contra *Fusarium oxysporum* y *Penicillium notatum*, y compuestos fenólicos como el ácido cafeico (Chóez-Guaranda et al., 2018; Chóez-Guaranda et al., 2021; Manzano et al., 2013; Manzano et al., 2014).

En la medicina tradicional es utilizada la decocción de sus hojas como un efectivo cicatrizante, antiinflamatorio, analgésico, antimicótico, anticancerígeno, y para el alivio del malestar estomacal (Apolo Arévalo & Rodríguez Saldaña, 2021; Manzano Santana et al., 2013). Además, se ha reportado que el extracto acuoso de sus hojas presenta actividad antimalárica eficaz contra el *Plasmodium falciparum*, y ayuda a combatir la leishmaniasis (Manzano Santana et al., 2013).

2.3. *Theobroma cacao* L.

El cacao (familia: *Malvaceae*) es un árbol nativo de las regiones tropicales y subtropicales de América (Magistrelli et al., 2012; Martínez-Ángel et al., 2015), cuyo fruto es muy utilizado en la industria para la obtención del chocolate y derivados (Magistrelli et al., 2012). La cascarilla de cacao es el principal subproducto obtenido en el procesamiento de los granos de cacao, la cual tiene un alto valor nutricional, es una buena fuente de fibra, compuestos aromáticos, presenta alto contenido de compuestos fenólicos (6.04 ± 0.12 mg GAE/g) como la catequina, epicatequina, y procianidinas con alta actividad antioxidante (Manzano et al., 2017), y alcaloides como la teobromina y la cafeína con actividades estimulantes del sistema nervioso (Panak Balentić et al., 2018; Barišić et al., 2020).

Gracias a los compuestos que presenta se le ha atribuido varios beneficios para la salud como para ayudar a combatir los factores asociados a enfermedades del síndrome metabólico como la hipertensión, hígado graso, regulación de glucosa y entre otras (Panak Balentić et al., 2018); ayuda a reducir el estrés oxidativo generado en el ejercicio, además de ser un buen estimulante aumentando el estado de alerta y desempeño en las actividades (Hernández-Hernández et al., 2022).

2.4. Bebidas funcionales

Las BF son bebidas que ofrecen beneficios para la salud humana y mejoran el bienestar físico, además de satisfacer el hambre y aportar con nutrientes al consumidor (Segura-Badilla et al., 2020). Estas bebidas pueden ser funcionales de manera natural como el té, que contiene compuestos antioxidantes o pueden elaborarse por la adición de compuestos

nutracéuticos como las vitaminas y polifenoles (Derkyi et al., 2018; Fuentes Berrio et al., 2015).

2.5. Estrés oxidativo y Antioxidantes

El estrés oxidativo se origina cuando existe un desequilibrio en el organismo, donde los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) se encuentran en mayor proporción que las defensas antioxidantes. La proliferación descontrolada de radicales libres puede inducir al desarrollo de algunas patologías como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas e inclusive desarrollo del cáncer (Coronado et al., 2015). Algunos factores como la obesidad, el consumo de tabaco, abuso de drogas y una mala alimentación pueden contribuir al estrés oxidativo (Mata et al., 2016).

Los antioxidantes son sustancias que se encargan de inhibir los radicales libres dentro del organismo. Estas moléculas captan el electrón desapareado del orbital de los radicales libres y los neutralizan, de esta manera logran un equilibrio para la disminución del estrés oxidativo. Es conocido que el consumo de alimentos ricos en compuestos antioxidantes como las frutas, verduras y hierbas, pueden ayudar a la prevención de enfermedades y promover un buen estado de salud (Fuentes Berrio et al., 2015; Coronado et al., 2015).

2.6. Estudios toxicológicos

Existen sustancias que pueden causar daño en los organismos vivos a nivel celular o molecular. Por este motivo es necesario que se lleven a cabo ensayos toxicológicos para conocer los posibles daños causados por la exposición aguda o crónica de una sustancia e identificarla según su nivel de toxicidad (Solari & Ríos, 2009). Por razones éticas, previo a que una sustancia sea probada en humanos, se requiere que se realicen ensayos preclínicos con animales experimentales. Estos ensayos permiten medir la eficacia y seguridad de un determinado producto, establecer una dosis segura del producto e identificar los posibles órganos diana del daño. Dentro de estos ensayos se pueden mencionar los estudios de toxicidad aguda y crónica, dosis repetidas, inmunogenicidad, carcinogenicidad y entre otras (Martínez-Hidalgo, 2007).

Los estudios de toxicidad aguda permiten evaluar los signos o manifestaciones clínicas, así como los órganos diana del daño inducido por una sustancia a una dosis única durante un periodo corto de tiempo (OECD, 2000). La Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE), establece guías estandarizadas para el cumplimiento de

requisitos acerca de la evaluación de la seguridad humana para fines regulatorios (Kluxen et al., 2021), donde se indican los métodos que permiten evaluar la toxicidad oral aguda: Método de la dosis fija (420), método de las clases de toxicidad aguda (423) y método arriba y abajo (425) (OECD, 2000).

2.7. Hígado y enfermedades hepáticas

El hígado es uno de los órganos más importantes en el ser humano, ya que cumple funciones primordiales en diversos procesos fisiológicos como el metabolismo y la desintoxicación de sustancias en el organismo (Trefts et al., 2018). Por este motivo, el hígado está expuesto a sufrir daños frente diversos factores como los virus, bacterias, consumo de alcohol y abuso de medicamentos. Este daño puede conllevar al desarrollo de enfermedades como esteatosis, fibrosis, cirrosis, hasta un carcinoma hepatocelular (Adhyapok et al., 2021).

De acuerdo con la OMS, más del 10% de la población a nivel mundial sufre de daños hepáticos (Ren et al., 2019). Una de las formas de valorar la función hepática, es el análisis de los niveles de marcadores hepáticos, como la AST y ALT, cuyo desbalance en sus niveles, puede ser un indicador de daño hepatocelular (Arredondo Bruce et al., 2019). Las transaminasas, ALT y AST, son enzimas intracelulares que catalizan reacciones de transaminación, empleadas como biomarcadores hepáticos séricos (Bai et al., 2020). La ALT es la más específica al referirnos a daño hepático ya que se localiza de manera exclusiva en el citosol del hepatocito, mientras que la AST además del citosol y mitocondria del hígado, puede encontrarse también en las células del corazón, riñones u otros órganos (Du et al., 2021). Por lo general, estas dos enzimas se suelen analizar juntas en los estudios de hepatotoxicidad ya que ambas son de gran importancia para el diagnóstico clínico del nivel de lesión hepática. La elevación sérica de estas enzimas se relaciona con el vertido del contenido enzimático de los hepatocitos dañados al torrente sanguíneo indicando lesión en el tejido (Bai et al., 2020). Así, pues, se puede considerar la enfermedad hepática como la causa más importante del aumento de la actividad de la ALT en conjunto con la AST, lo que se asocia al estrés oxidativo generado por agentes tóxicos (Li et al., 2021).

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

Para la ejecución de esta tesis, se realizó un estudio de tipo experimental, transversal y prospectivo. El esquema de trabajo elaborado para la ejecución del estudio se encuentra resumido en la Figura 1. Como primera fase del estudio, se realizó la preparación de las formulaciones de la bebida funcional y como segunda fase se ejecutaron los ensayos preclínicos de toxicidad oral aguda y la actividad farmacológica hepatoprotectora.

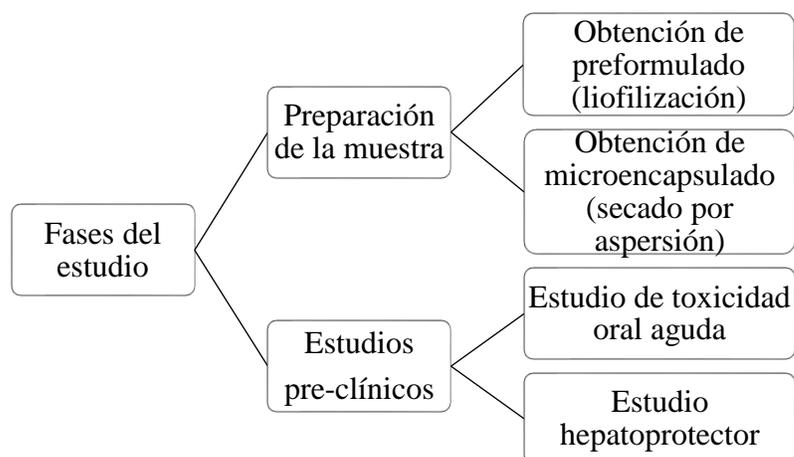


Figura 1. Esquema general del estudio

3.1. Material vegetal

Como material vegetal se utilizó hojas de *Ilex guayusa* Loes (Aquifoliaceae) (CIBE020), obtenidas del cantón Taisha, Morona Santiago; hojas de *Vernonanthura patens* H. Rob. (Asteraceae) (CIBE037) obtenidas del cantón Marcabelí, El Oro; y cascarillas de cacao provistas por Maquita Cushunchic (MCCH), Guayaquil, Guayas (Quijano-Avilés, 2019). Las muestras fueron recolectadas bajo la autorización del Ministerio del Ambiente (MAE) (No. 013-2017-ICFLO-DNB/-MAE).

3.2. Animales de experimentación

Para el estudio de toxicidad oral aguda se utilizaron ratones albinos hembras cepa CF1, biológicamente sanas y nulíparas, (peso: 20±5g; edad: 8 semanas) obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI). Los animales se alojaron en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil dentro de jaulas plásticas de polipropileno y fueron alimentadas con una dieta estándar de pellets para roedor y agua *ad libitum* (Li et al., 2020).

Para el estudio del efecto hepatoprotector se utilizaron ratones albinos machos cepa BALB/c, biológicamente sanos, (peso promedio: 33 g; edad: 11 semanas). Los animales fueron obtenidos y alojados en el bioterio de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE) dentro de jaulas plásticas de polipropileno y provisionados de una dieta estándar de pellets para roedor y agua *ad libitum* (Li et al., 2020).

Durante todo el periodo de experimentación, los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de laboratorio (22 ± 3 °C, humedad relativa 30-70% y ciclos de luz/oscuridad de 12 h) y pasaron por un periodo de aclimatación de una semana antes del inicio del ensayo (Al-Afifi et al., 2018). Los procedimientos con los animales fueron realizados de acuerdo a los principios de las 3 Rs (National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research, n.d.) y las directrices de la comunidad europea para manejo ético de animales de laboratorio (2010/63/EU) (European Commission, 2019). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de ética en el uso de animales de investigación y docencia de la Universidad de San Francisco de Quito (No. 2019-017b).

3.3. Reactivos y equipos

Los reactivos utilizados para el estudio fueron: Paracetamol (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, USA), Silimarina (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, USA), agua destilada, solución salina 0.09%, formalina 10%. Se utilizaron los siguientes equipos: Liofilizador (Freeze Dryer 4.5, Labconco™, USA), spray dryer (Spray dryer SD Basic, Armfield®, Blashford, United Kingdom), balanza (UW8200S scale, Shimadzu®, Kyoto, Japan), microscopio óptico (Stereomicroscope, Carl Zeiss™ Stemi™ DV4 series, Oberkochen, Germany), centrífuga (Thermo Fisher scientific, USA).

3.4. Preparación de la muestra de la BF

Las muestras fueron preparadas en el Laboratorio de Bioproductos y Bioprocesos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), ESPOL, Guayaquil, Ecuador. Las hojas de *I. guayusa*, *V. patens* y las cascarillas de cacao fueron secadas, molidas y tamizadas de manera individual; y se mezclaron en las proporciones establecidas en la fórmula (11591SECRETOCIBE). Posteriormente, se elaboraron dos formulaciones de la BF, pre-formulado y microencapsulado, siguiendo la metodología de Quijano-Avilés (2019). Se pesó 10 g de la fórmula para la preparación del pre-formulado y 10 g para la preparación del microencapsulado. Estos se llevaron a infusión de manera individual en 1 L de agua destilada por 5 min y los extractos obtenidos se filtraron a través de papel Whatman # 1. Para la obtención del pre-formulado, el extracto correspondiente se llevó a liofilización (Freeze Dryer 4.5, Labconco™, USA) a -40 °C durante 72 h.

Para la obtención del microencapsulado, al extracto obtenido se le agregó maltodextrina (10%) y se homogeneizó a 300 rpm, luego esta solución fue secada por secado por aspersión (Spray dryer SD Basic, Armfield®, Blashford, United Kingdom), con un flujo de alimentación de 3.5 ml.min⁻¹, suministro de aire comprimido de 50 ml.min⁻¹ a 4 bares y temperatura de entrada del aire a 120 °C. Este proceso se realizó en el Laboratorio de Ingeniería en Alimentos de la FIMCP – ESPOL (Quijano-Avilés, 2019).

3.5. Estudio de toxicidad oral aguda

El estudio de toxicidad oral aguda se realizó de acuerdo a las directrices de la guía estandarizada de la dosis fija No. 420 de la Organización de Cooperación y Desarrollo Económico (OECD, 2001) (Fig. 2).

3.5.1. Diseño experimental

Los ratones se distribuyeron de manera aleatoria en tres grupos de 5 animales cada uno, y previo a la administración de los tratamientos fueron sometidos a ayuno de 4 h con acceso libre al agua (Shin et al., 2020). Se realizó la administración de una dosis ponderal de los tratamientos por vía oral con ayuda de una cánula bucoesofágica de la siguiente forma: los ratones del primer y segundo grupo recibieron el tratamiento de pre-formulado y microencapsulado disueltos en agua (vehículo), respectivamente, en monodosis de 2000 mg/kg, mientras que los ratones del tercer grupo sirvieron como control negativo a los cuales se les administró únicamente agua. El volumen administrado fue de 300 μ L por animal, considerando el volumen máximo de líquido para la administración en ratones: 1 mL/100g (OECD, 2001).

3.5.2. Evaluaciones toxicológicas

Luego de la administración de los tratamientos, los animales fueron observados diariamente durante un periodo de evaluación de 14 días (Aneeshkumar et al., 2018), para detectar posibles signos clínicos de dolor, estrés o sufrimiento asociados a toxicidad en animales (OECD, 2000). En consecuencia, se monitorearon cambios en los patrones de comportamiento y apariencia física, variaciones en el peso corporal y cambios en la alimentación. Se evaluó la presencia de somnolencia, cambios en la piel (ictericia), pelaje (piloerección o pelaje áspero), postura (columna jorobada), presencia de secreciones nasales, disnea, temblores, convulsiones y muerte (OECD, 2001; Ullman-culleré & Foltz, 1999).

Además, se registró el peso corporal de cada animal el primer día antes de la administración del tratamiento, a los 7 días tras la administración y el último día del ensayo (día 14), esto permitió determinar cambios significativos en el peso corporal de los ratones tratados con la bebida funcional en comparación con el grupo control (Ng'uni et al., 2018; Rojas-Armas et al., 2019). El consumo de alimento y agua fue registrado

diariamente mediante la medición de la cantidad suministrada y la cantidad sobrante de cada grupo (Aneeshkumar et al., 2018).

3.5.3. Análisis anatomopatológico

Al final del estudio, todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se recolectaron diferentes órganos vitales como el corazón, hígado, riñones y estómago para su posterior análisis (Rojas-Armas et al., 2019). Se analizó macroscópicamente (Stereomicroscope, Carl Zeiss™ Stemi™ DV4 series, Oberkochen, Germany), la posible presencia de alteraciones morfológicas de los distintos órganos en cuanto a color, tamaño y consistencia de los grupos tratados con relación al grupo control (Al-Afifi et al., 2018). Además, se calculó y registró el peso relativo de los órganos utilizando la fórmula: (Peso relativo: peso absoluto del órgano (g)/ peso corporal del animal al momento del sacrificio (g) x 100%) (Tsai et al., 2020). Adicionalmente se tomaron muestras de hígado, riñones y estómago de cada grupo los cuales fueron conservados en formalina al 10% para el análisis histopatológico (Hazarika et al., 2019).

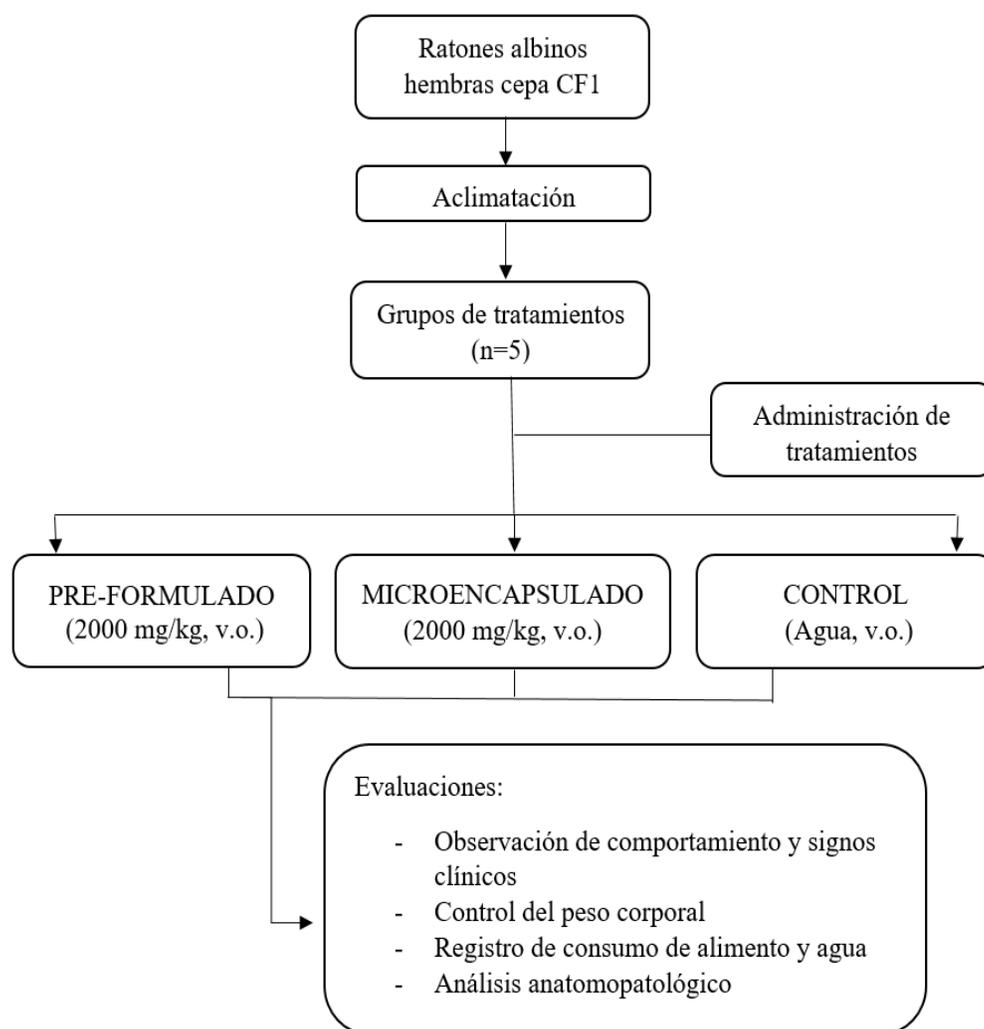


Figura 2. Esquema del estudio de toxicidad oral aguda

3.6. Estudio hepatoprotector

3.6.1. Diseño experimental

Para el diseño de este estudio se tomó como referencia el estudio de Jin et al. (2021), con ligeras modificaciones (Fig. 3). Se utilizaron ratones albinos machos, los cuales se distribuyeron de manera aleatoria en nueve grupos de 4 animales cada uno y se procedió a la administración de una dosis ponderal de los tratamientos de la siguiente manera:

Grupo I: Se estableció como grupo control normal o sano al cual se le administró una dosis diaria de agua destilada por vía oral (v.o.) por un periodo de 7 días. El día 7, 2 h después del tratamiento, se le administró agua destilada tibia por vía intraperitoneal (i.p.).

Grupo II: Identificado como el grupo modelo tóxico o enfermo, paracetamol (PAT), recibió una dosis diaria de agua destilada (v.o.) por un periodo de 7 días. El día 7, 2 h después del tratamiento, se le administró paracetamol disuelto previamente en agua destilada caliente (250 mg/kg, i.p.) para la inducción de daño hepático.

Grupo III: recibió una dosis diaria de silimarina (200 mg/kg, v.o.) por un periodo de 7 días. El día 7, 2 h después del tratamiento, se le administró paracetamol (250 mg/kg, i.p.).

Grupo IV: recibió una dosis diaria de pre-formulado (250 mg/kg, v.o.) por un periodo de 7 días. El día 7, 2 h después del tratamiento, se le administró paracetamol (250 mg/kg, i.p.).

Grupo V: recibió una dosis diaria de pre-formulado (500 mg/kg, v.o.) por un periodo de 7 días. El día 7, 2 h después del tratamiento, se le administró paracetamol (250 mg/kg, i.p.).

Grupo VI: recibió una dosis diaria de pre-formulado (1000 mg/kg, v.o.) por un periodo de 7 días. El día 7, 2 h después del tratamiento, se le administró paracetamol (250 mg/kg, i.p.).

Grupo VII: recibió una dosis diaria de microencapsulado (250 mg/kg, v.o.) por un periodo de 7 días. El día 7, 2 h después del tratamiento, se le administró paracetamol (250 mg/kg, i.p.).

Grupo VIII: recibió una dosis diaria de microencapsulado (500 mg/kg, v.o.) por un periodo de 7 días. El día 7, 2 h después del tratamiento, se le administró paracetamol (250 mg/kg, i.p.).

Grupo IX: recibió una dosis diaria de microencapsulado (1000 mg/kg, v.o.) por un periodo de 7 días. El día 7, 2 h después del tratamiento, se le administró paracetamol 250 mg/kg, i.p.).

Cabe mencionar que los ratones fueron sometidos a ayuno de 12 h antes de la inducción a daño hepático con paracetamol (Lin et al., 2019; McGill & Jaeschke, 2019). Se administró un volumen de 300 ul por animal, considerando las indicaciones de la OECD (1mL/ 100g) (OECD, 2001).

3.6.2. Análisis del perfil hepático

Luego de la inducción de daño hepático con paracetamol, se procedió a sacrificar a los animales, y se realizó la toma de muestra sanguínea de la aorta abdominal en tubos de 1.5 mL, los cuales se almacenaron a -20 °C, para el posterior análisis de las enzimas, biomarcadores indicadores de daño hepático, AST y ALT, en suero sanguíneo (Xie et al., 2016).

3.6.3. Análisis anatomopatológico

Se realizó la extracción de los hígados y se observó macroscópicamente la posible presencia de alteraciones en sus características morfológicas tal como, color, tamaño y consistencia, lo cual se registró para la comparación de los diferentes grupos experimentales (Al-Afifi et al., 2018). Además, se calculó y registró el peso relativo de los hígados, utilizando la fórmula: (Peso relativo: peso absoluto del órgano (g)/ peso corporal del animal al momento del sacrificio (g) x 100%) (Tsai et al., 2020). Adicionalmente se tomaron muestras de hígado de cada grupo los cuales fueron conservados en formalina al 10% para el análisis histopatológico (Hazarika et al., 2019).

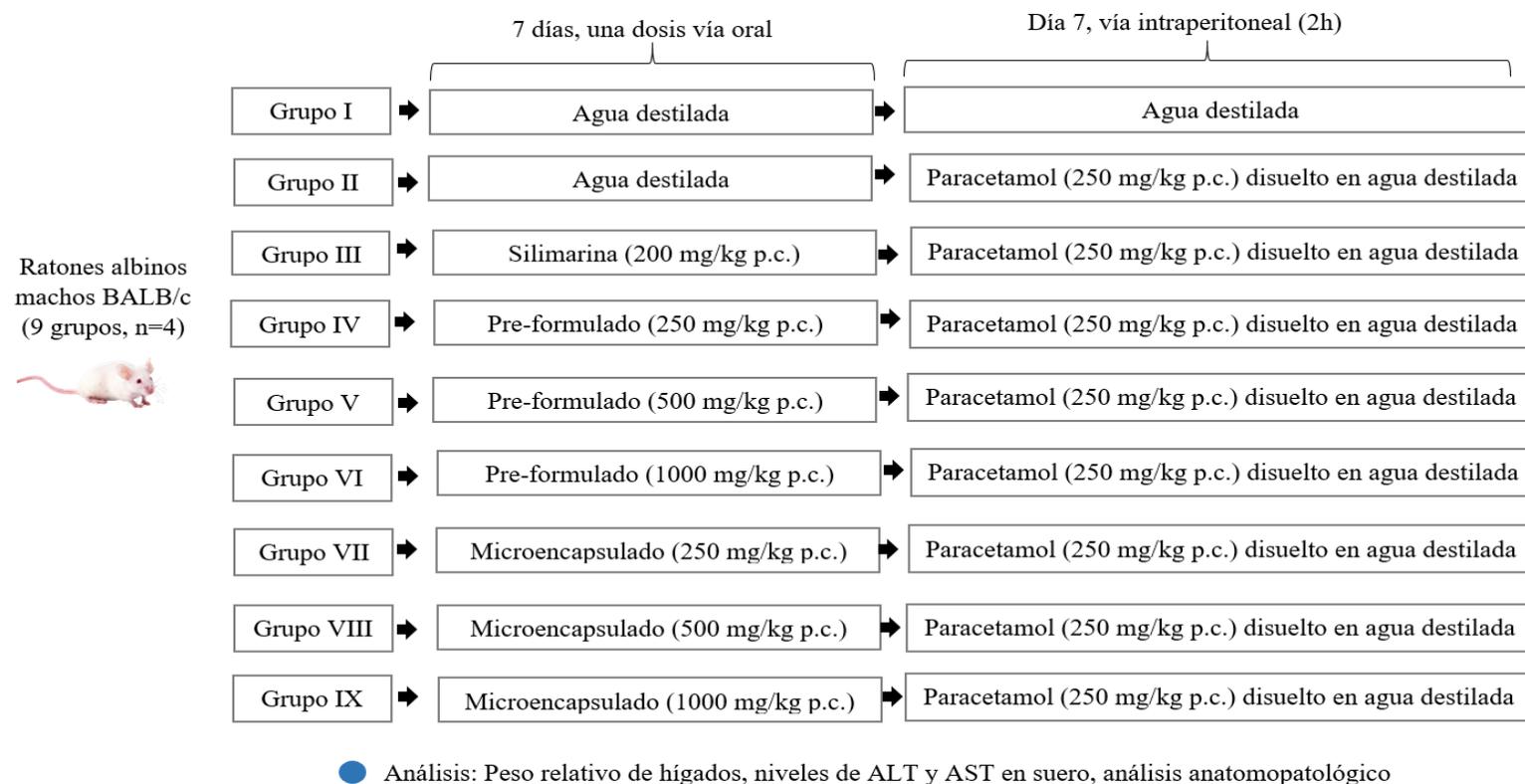


Figura 3. Esquema del estudio hepatoprotector

3.7. Análisis de datos

Los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar (DE). En el estudio toxicológico, se realizó la comparación de los datos de los parámetros (peso corporal, peso de hígados, consumo de alimento y agua) entre los grupos de tratamiento y control, los cuales se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido del test de Tukey. Respecto al análisis del estudio hepatoprotector, ante la falta de homogeneidad de varianza de los datos de las variables (AST y ALT), se realizó una transformación de los datos mediante la función logaritmo: $\text{variable}02 = \log(x)$, y para asegurar el cumplimiento de normalidad de los residuos se aplicó la prueba de Shapiro-Wilks. Los promedios de los parámetros evaluados (AST, ALT y peso de hígados), se analizaron mediante ANOVA seguido del test de Tukey. En todos los análisis, las diferencias se consideraron significativas a un valor de $p < 0.05$ (Saleem et al., 2017). Se utilizó el software R versión 3.6.3.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Estudio de toxicidad oral aguda

De manera general, no se observó signos de toxicidad o muertes durante el periodo de estudio de 14 días en ninguno de los animales tratados con el pre-formulado y el microencapsulado a la dosis única de 2000 mg/kg, v.o. Los tratamientos evaluados no causaron cambios en los patrones de comportamiento y todos los animales presentaron una apariencia física normal acorde al grupo control.

4.1.1. Peso corporal, y consumo de alimento y agua

Los pesos corporales del día 1, 7 y 14; y el consumo de alimento y agua se muestran en la Tabla I. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los pesos corporales de los grupos de tratamiento respecto al grupo control. Los animales presentaron un aumento progresivo del peso corporal a lo largo del periodo de estudio. Tampoco se observó alteraciones en el consumo de agua de los grupos tratados respecto al grupo control. Referente a la ingesta de alimento, no se observó diferencias estadísticamente significativas en la alimentación entre el grupo pre-formulado con el control, pero sí diferencias entre el grupo tratado con el microencapsulado vs. el control ($p=0.029$). Este comportamiento se puede asociar al componente maltodextrina presente en la fórmula del microencapsulado, este carbohidrato presenta un índice glucémico alto, que aumenta la glucosa en sangre y acelera la entrada de glucosa a las células, reduciendo la glicemia que desencadena una señal cerebral para aumentar los niveles de azúcar en sangre, produciendo una sensación de hambre que estimula una mayor ingesta de alimento (Durán et al., 2013; Rigamonti et al., 2019).

En un contexto toxicológico, se espera que la toxicidad adversa causada por el efecto nocivo de una sustancia genere una disminución o ausencia del consumo de alimentos y agua, lo que va de la mano con una pérdida significativa del peso corporal (OCDE, 2000; Ullman-culleré y Foltz, 1999). Es relevante mencionar que la reducción de más del 20% del peso corporal de un animal tratado en comparación con el control se considera un estado crítico y se define como uno de los criterios de valoración en animales en muchas guías internacionales (Al-Afifi et al., 2018; OCDE, 2000). Por lo tanto, se puede decir que en este estudio los tratamientos no causaron una alteración

asociada a toxicidad de los patrones de alimentación, ni de los pesos corporales de los ratones a la dosis administrada de 2000 mg/kg.

Tabla I. Peso corporal, consumo de alimento y agua de los grupos tratados con la BF y el grupo control. Valores expresados como la media \pm DE

Variable	Pre-formulado	Microencapsulado	Control	P-value
<i>Peso corporal (g)</i>				
Día 1	27.90 \pm 1.32	28.56 \pm 1.84	27.08 \pm 1.41	0.347
Día 7	29.72 \pm 2.61	30.86 \pm 1.71	28.76 \pm 1.34	0.276
Día 14	31.58 \pm 3.14	31.78 \pm 2.26	30.18 \pm 0.95	0.507
<i>Alimento (g) y agua (mL)</i>				
Agua	25.71 \pm 2.81	26.86 \pm 6.09	24.43 \pm 4.52	0.396
Alimento	21.17 \pm 1.56	22.55 \pm 2.62	20.24 \pm 2.30	0.029*

Grupos tratados con el pre-formulado y el microencapsulado de la BF a una dosis única oral de 2000 mg/kg, y grupo control con agua potable.

4.1.2. Observaciones macroscópicas, peso relativo de órganos y análisis histopatológico

En general, no se observaron alteraciones macroscópicas del corazón, hígado, estómago y riñones de los animales. Los órganos de los grupos tratados con el pre-formulado y el microencapsulado a la dosis única oral de 2000 mg/kg presentaron una coloración, consistencia y tamaño normal acorde al grupo control. Así, el corazón presentó un color rojo y consistencia firme, el hígado color rojo vinoso de consistencia firme, los riñones un color rojo grisáceo de consistencia firme y el estómago una coloración crema y consistencia suave y firme (Fig. 4).

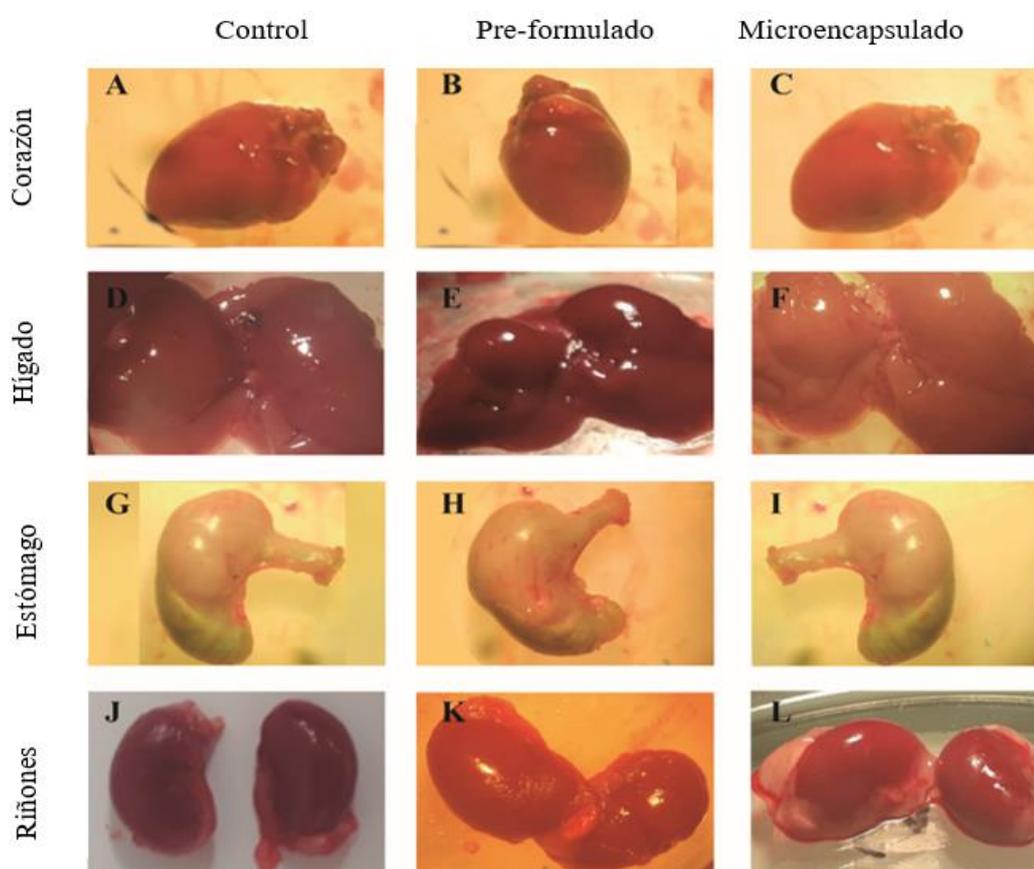


Figura 4. Visualización macroscópica del corazón (A, B y C), hígado (D, E y F), estómago (G, H e I), y riñones (J, K y L) de los grupos tratados con el pre-formulado y el microencapsulado de la BF a la dosis única oral de 2000 mg/kg, y el grupo control.

No se observó diferencias significativas en los pesos relativos de los órganos de los grupos tratados respecto al grupo control (Tabla II). Tampoco se reportaron hallazgos significativos en el análisis histopatológico de las muestras de hígado, riñones y corazón de los grupos tratados y control. Los órganos de los grupos tratados con el pre-formulado y el microencapsulado a la dosis única oral de 2000 mg/kg presentaron una arquitectura normal acorde al grupo control (Fig. 5). De este modo, la ausencia de alteraciones macro y microscópicas de los órganos permitió concluir que los tratamientos no causaron daño dirigido a los órganos a la dosis única de 2000 mg/kg. Algunos órganos vitales como el hígado, corazón, riñones y estómago a menudo se ven afectados por las sustancias que ingresan al organismo, por este motivo su evaluación es de suma importancia para identificar posibles efectos nocivos (Worasuttayangkurn et al., 2019).

Tabla II. Peso relativo de los órganos de los grupos tratados con la BF y el grupo control. Valores expresados como la media \pm DE, n=5

Órganos	Pre-formulado	Microencapsulado	Control	P-value
Corazón	0.50 \pm 0.05	0.48 \pm 0.04	0.45 \pm 0.06	0.334
Hígado	4.77 \pm 0.24	5.07 \pm 0.52	4.59 \pm 0.59	0.313
Estómago	1.31 \pm 0.13	1.54 \pm 0.16	1.64 \pm 0.52	0.300
Riñones	1.31 \pm 0.06	1.35 \pm 0.06	1.38 \pm 0.15	0.582

Grupos tratados con el pre-formulado y microencapsulado de la BF a una dosis única oral de 2000 mg/kg, y el grupo control.

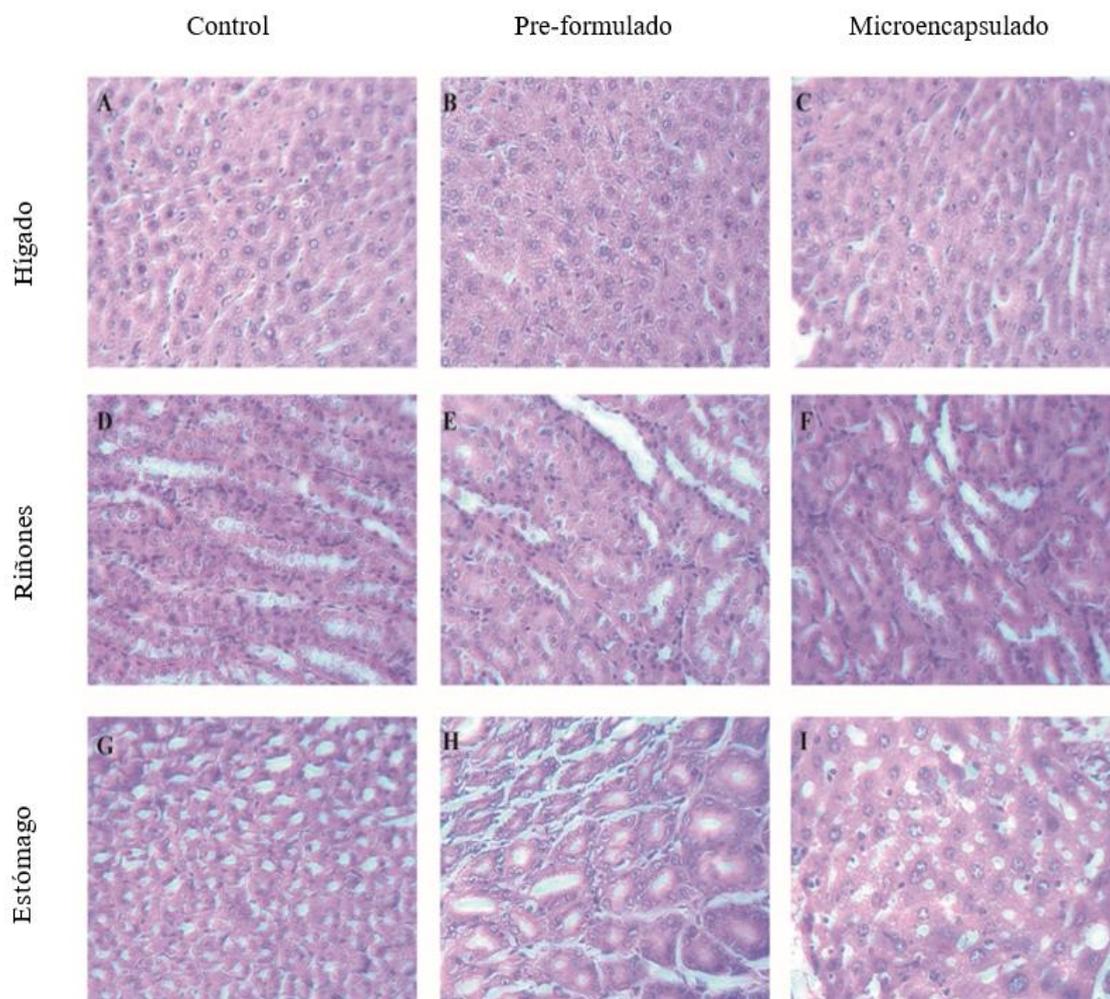


Figura 5. Microfotografías de cortes histológicos de los órganos embebidos en parafina y teñidos con hematoxilina/eosina (40x). Hígado (A, B y C), riñones (D, E y F) y estómago (G, H e I) de los grupos tratados con el pre-formulado y microencapsulado de la BF a una dosis única oral de 2000 mg/kg, y el grupo control.

4.2. Estudio hepatoprotector

4.2.1. Observación macroscópica, peso relativo e histopatología de los hígados

En la Fig. 6 se muestran las fotografías macroscópicas de los hígados de los diferentes grupos experimentales. Se observó que los hígados del grupo I, control sano, al cual solo se le administró agua, presentaron sus características normales con color rojo vinoso, consistencia suave y tamaño de apariencia normal. En contraste, el grupo II (modelo enfermo), que sólo recibió la dosis de PAT (250 mg/kg) sin ningún tratamiento preventivo, presentó hígados agrandados con una coloración pálida blanquinosa y pigmentaciones oscuras en algunas zonas, además se observó la formación de pequeños nódulos y bandas fibróticas. Por otra parte, las piezas hepáticas del grupo III, que recibió la silimarina (200 mg/kg), presentaron una coloración pálida blanquecina y pequeños nódulos en algunas zonas.

Con relación al pre-tratamiento de pre-formulado, el grupo IV, que recibió el pre-formulado a la dosis de 250 mg/kg presentó hígados de apariencia similar al control normal, el grupo VI (pre-formulado, 1000 mg/kg), presentó hígados con ligero daño. Mientras que el grupo V (pre-formulado, 500 mg/kg), presentó hígados con una coloración pálida blanquecina, presencia de grasa y algunas zonas con pequeños nódulos similar al modelo tóxico. En cuanto al microencapsulado, todos los grupos presentaron lesiones hepáticas similares al grupo modelo tóxico. Por lo que se refiere a los pesos relativos de los hígados, no se observó diferencias significativas entre los grupos experimentales (Tabla III).

En este contexto, cuando el hígado es lesionado, su funcionamiento normal se ve comprometido, e inicialmente se produce una inflamación, ya que el sistema inmune se activa para tratar de combatir y curar el daño mediante la autoregeneración. Pero cuando la lesión es fuerte, esta puede conducir a la formación de fibrosis (acumulación de tejido cicatricial), y la progresión de la fibrosis se basa en el nivel de daño ocasionado en el tejido hepático, el estrés oxidativo generado y la respuesta inmune. En consecuencia, cuando el hígado no es tratado y existe una cicatrización excesiva y constante del tejido, se conduce a una cirrosis y en las últimas instancias un carcinoma hepatocelular (Kweon et al., 2020).

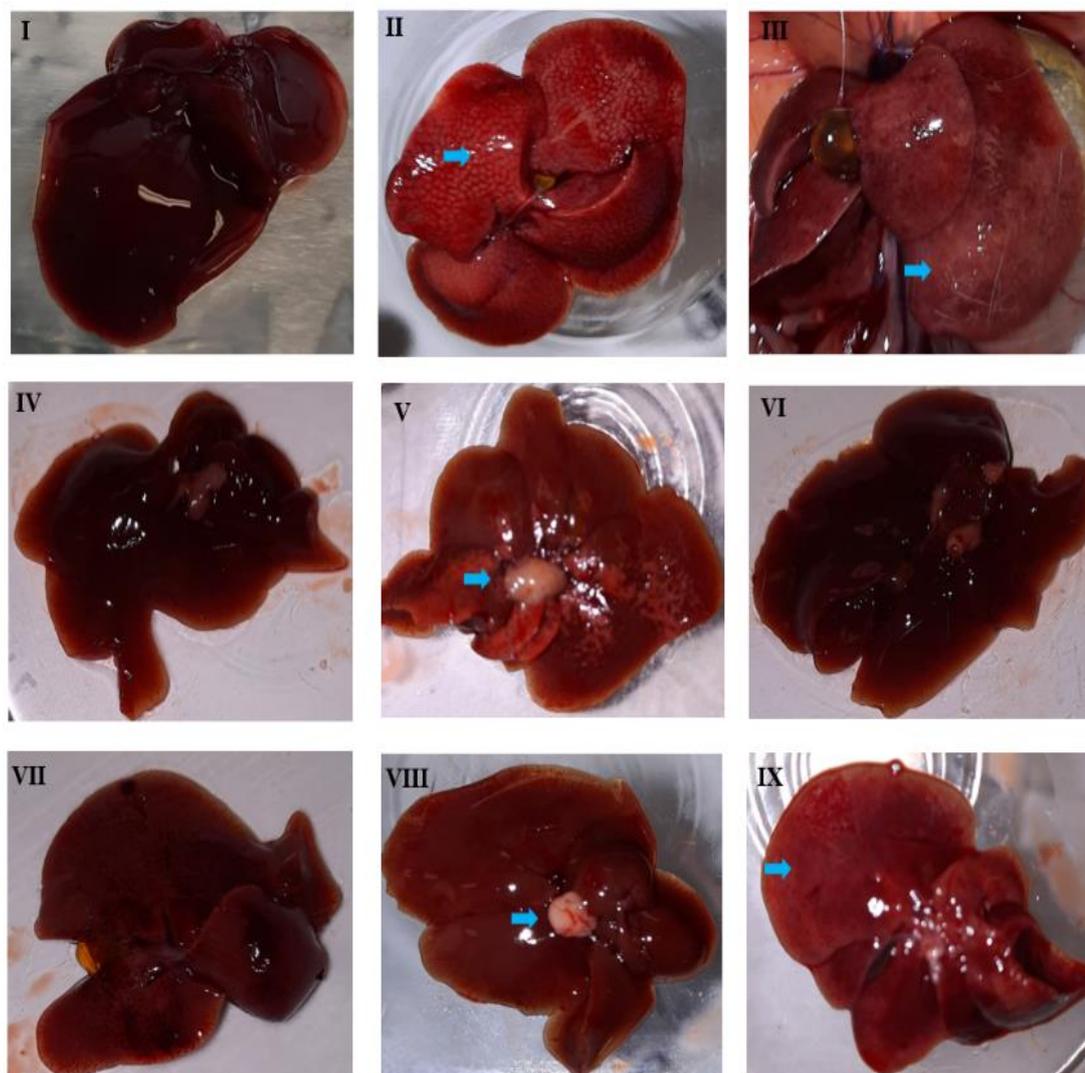


Figura 6. Fotografías macroscópicas de los hígados. Grupo I (control normal), grupo II (modelo tóxico, PAT 250 mg/kg), grupo III (silimarina 200 mg/kg) + PAT, grupo IV (pre-formulado 250 mg/kg) + PAT, grupo V (pre-formulado 500 mg/kg) + PAT, grupo VI (pre-formulado 1000 mg/kg) + PAT, grupo VII (microencapsulado 250 mg/kg) + PAT, grupo VIII (microencapsulado 500 mg/kg) + PAT, grupo IX (microencapsulado 1000 mg/kg) + PAT.

Tabla III. Peso relativo de los hígados de los grupos experimentales del estudio hepatoprotector. Valores expresados como la media \pm DE, n=4

Grupos	Peso relativo de los hígados
I	5.31 \pm 1.09
II	5.58 \pm 0.31
III	6.08 \pm 0.60
IV	5.61 \pm 0.29
V	5.72 \pm 0.63
VI	5.15 \pm 0.64
VII	5.49 \pm 0.7
VIII	5.66 \pm 0.44
IX	6.06 \pm 1.35

Grupo I (control normal), grupo II (modelo tóxico, PAT 250 mg/kg), grupo III (silimarina 200 mg/kg) + PAT, grupo IV (pre-formulado 250 mg/kg) + PAT, grupo V (pre-formulado 500 mg/kg) + PAT, grupo VI (pre-formulado 1000 mg/kg) + PAT, grupo VII (microencapsulado 250 mg/kg) + PAT, grupo VIII (microencapsulado 500 mg/kg) + PAT, grupo IX (microencapsulado 1000 mg/kg) + PAT. *P-value*: 0.711.

El reporte del análisis histopatológico (Fig. 7) indicó que no se observaron daños en los hígados del grupo control normal (I) ya que estos presentaron su arquitectura celular intacta. Por otro lado, en contraste con el grupo control normal (I), los hígados del grupo modelo tóxico (II) a los que solo se les administró PAT (250 mg/kg), presentaron una alteración de la arquitectura hepática, como tumefacción de los hepatocitos, necrosis e infiltración de células inflamatorias.

En el grupo III que fue tratado con la silimarina (200 mg/kg) se identificó una manifiesta tumefacción celular y necrosis. Respecto al pre-formulado, tanto en el grupo IV (250 mg/kg) como en el grupo VI (1000 mg/kg), se reportó una leve tumefacción celular y ligera degeneración grasa. Mientras que en el grupo V (500 mg/kg), se encontró una muy manifiesta degeneración grasa parenquimal. Por otro lado, respecto a la fórmula de microencapsulado, en el grupo VII (250 mg/kg) se reportó una severa degeneración grasa parenquimal. En el grupo VIII (500 mg/kg), se observó una severa tumefacción celular e infiltración inflamatoria, y en el grupo IX (1000 mg/kg) se indicó una importante degeneración grasa, necrosis celular e infiltración de células inflamatorias.

Los hepatocitos son células multifuncionales y de gran versatilidad, que constituyen la mayor parte del volumen del hígado (Trefts et al., 2018). Estos ejercen funciones para el establecimiento de la estructura del hígado y la función hepática, por lo que son sujetos a diversos protocolos de investigación en temas como la regeneración, así como en el estudio del metabolismo de nutrientes y la toxicidad causada por los medicamentos (Ríos-López et al., 2020). La lesión hepática inducida por fármacos y la muerte celular puede resultar del estrés oxidativo generado en los hepatocitos. Un patrón inicial es el daño centrolobulillar en el modelo de PAT, que se expande por comunicación de las células estresadas y la activación del sistema inmunológico, lo que puede contribuir a un proceso de cicatrización del tejido. Si bien la proliferación de los hepatocitos contrarresta la pérdida de células causada por la lesión, una dosis alta aguda puede ser letal para el tejido (Adhyapok et al., 2021).

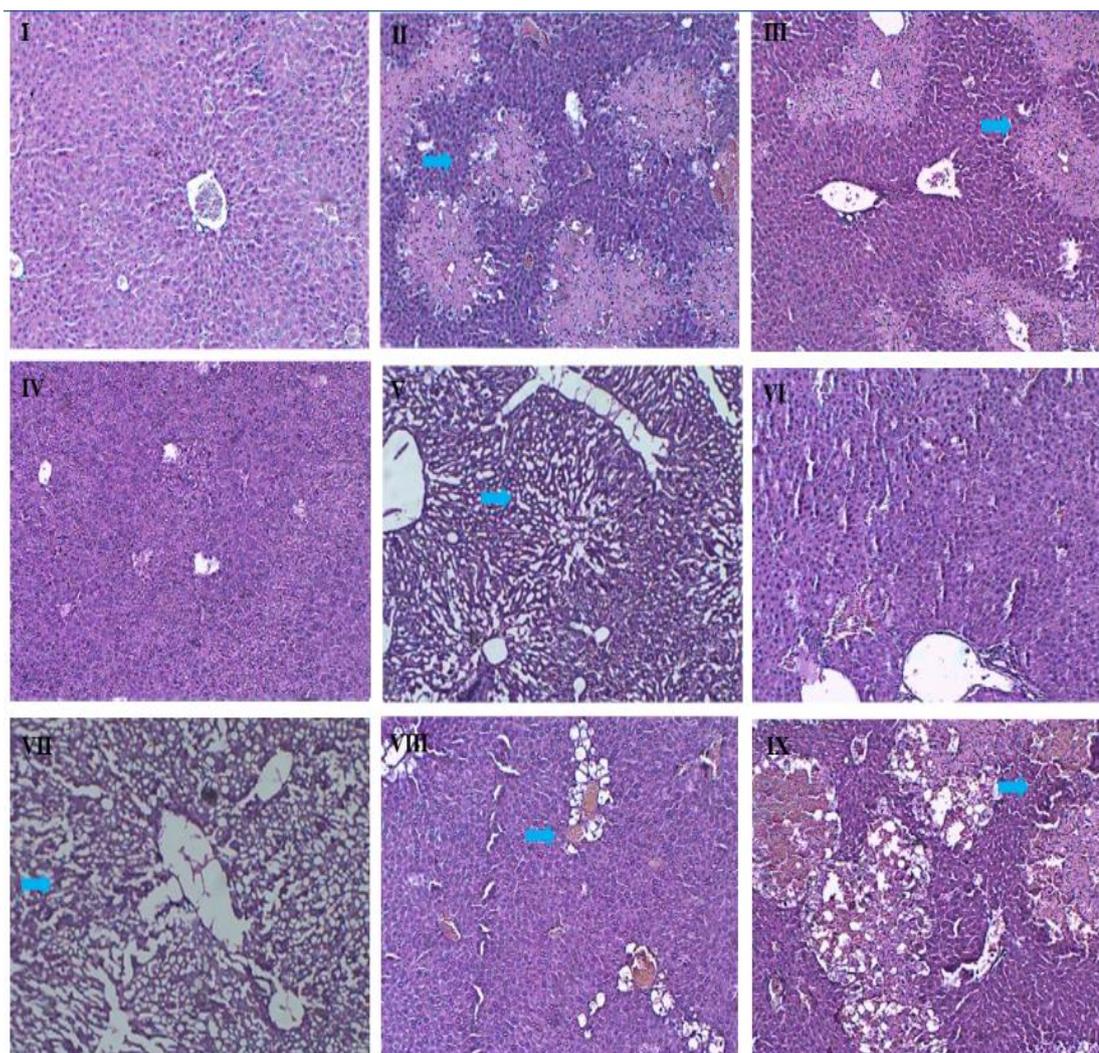


Figura 7. Microfotografías de cortes histológicos de los hígados embebidos en parafina y teñidos con hematoxilina/eosina (40x). Grupo I (control normal), grupo II (modelo tóxico, PAT 250 mg/kg), grupo III (silimarina 200 mg/kg) + PAT, grupo IV (pre-formulado 250 mg/kg) + PAT, grupo V (pre-formulado 500 mg/kg) + PAT, grupo VI (pre-formulado 1000 mg/kg) + PAT, grupo VII (microencapsulado 250 mg/kg) + PAT, grupo VIII (microencapsulado 500 mg/kg) + PAT, grupo IX (microencapsulado 1000 mg/kg) + PAT.

4.2.2. Efecto de la BF sobre los niveles serológicos de las enzimas hepáticas ALT y AST

El análisis funcional enzimático del hígado valorado por las enzimas, AST y ALT, se observa en la Fig. 8 (A y B). Los ratones del grupo II, (modelo tóxico), a los cuales sólo se les indujo el daño hepático con PAT (250 mg/kg), presentaron un incremento significativo de los valores de las enzimas ALT y AST en comparación con el grupo control normal (grupo I), lo que sugiere un daño hepatocelular causado por el fármaco. El grupo III, tratado con el tratamiento preventivo de silimarina (200 mg/kg), no presentaron diferencia significativa en los niveles de ambas enzimas, ALT y AST, respecto al grupo modelo tóxico, (II, PAT, 250 mg/kg) (datos no mostrados).

Por otro lado, se observó que las administraciones del pre-tratamiento del pre-formulado a las diferentes dosis evaluadas actuaron de manera dosis-dependiente. Los ratones del grupo IV (pre-formulado, 250 mg/kg) y los del grupo VI, (pre-formulado, 1000 mg/kg), presentaron una reducción estadísticamente significativa de los niveles de ambas enzimas en comparación con el grupo II, (PAT, 250 mg/kg). Mientras que los ratones del grupo V, (pre-formulado, 500 mg/kg), no presentaron una diferencia significativa en los niveles de ambas enzimas respecto al grupo II (PAT, 250 mg/kg). Indicándose así, que la dosis baja del pre-formulado ayudó a contrarrestar los daños ocasionados por el PAT a nivel enzimático.

Respecto a la fórmula del microencapsulado, se observó que las diferentes dosis evaluadas también actuaron de manera dependiente de la dosis. Los ratones del grupo VII (microencapsulado, 250 mg/kg) y del grupo IX (microencapsulado, 1000 mg/kg) no presentaron diferencia significativa de los niveles de ALT y AST con el grupo II (PAT, 250 mg/kg). Por otro lado, los ratones del grupo VIII (microencapsulado, 500 mg/kg) no presentaron una diferencia significativa en los niveles de las enzimas con el grupo II (PAT, 250 mg/kg), pero tampoco con el grupo control normal (I). Además, se puede decir también que en cuanto al microencapsulado; sus diferentes dosis no presentaron diferencias significativas.

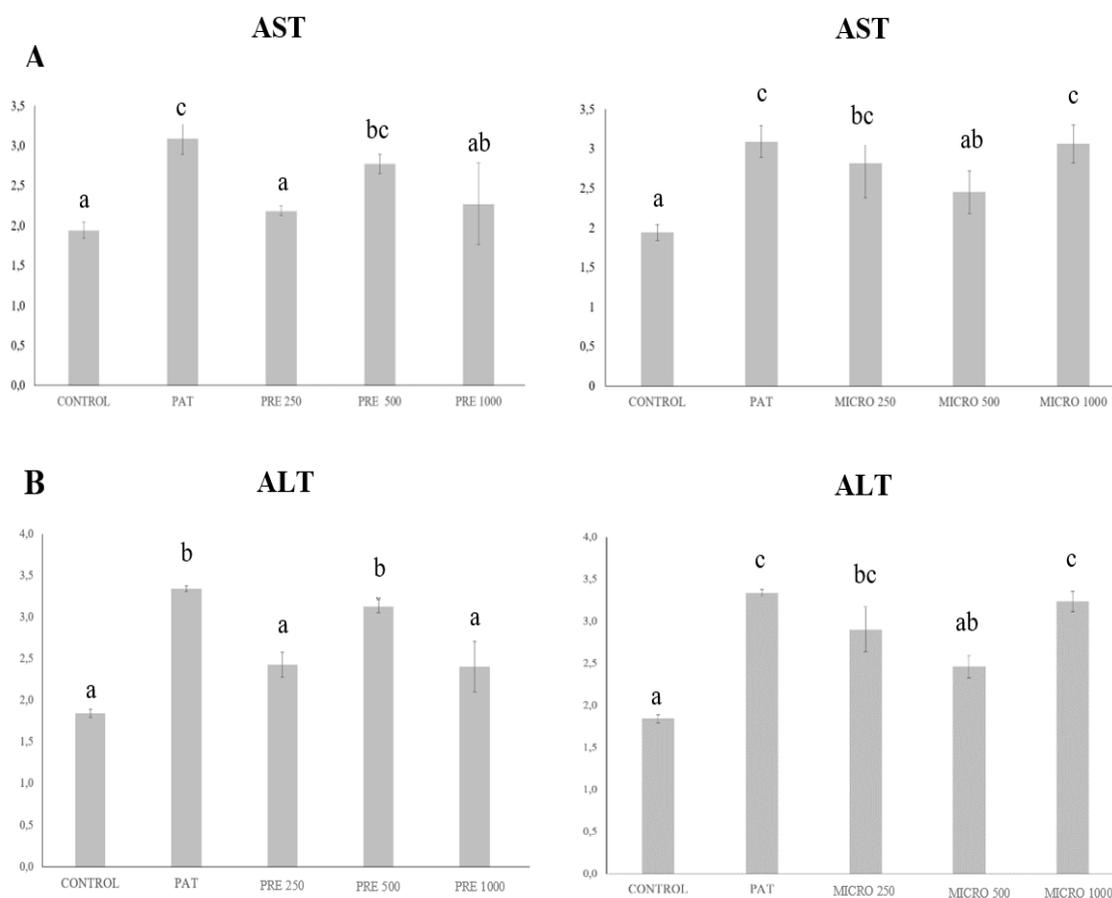


Figura 8. Efecto de los tratamientos de la BF sobre los niveles séricos de AST (A) y ALT (B). media ± DE (n=4). I (CONTROL, control normal), grupo II (PAT, modelo tóxico, PAT 250 mg/kg), grupo IV (PRE 250, pre-formulado 250 mg/kg) + PAT, grupo V (PRE 500, pre-formulado 500 mg/kg) + PAT, grupo VI (PRE 1000, pre-formulado 1000 mg/kg) + PAT, grupo VII (MICRO 250, microencapsulado 250 mg/kg) + PAT, grupo VIII (MICRO 500, microencapsulado 500 mg/kg) + PAT, grupo IX (MICRO 1000, microencapsulado 1000 mg/kg) + PAT.

Dado que las preparaciones herbales se encuentran compuestas de múltiples fitoquímicos bioactivos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, su combinación podría resultar beneficiosa para tratar o prevenir varias enfermedades como el cáncer, enfermedades crónicas y enfermedades asociadas al síndrome metabólico (González-Ponce et al., 2016). Por lo tanto, la identificación y validación científica de plantas con actividad farmacológica es el principal objetivo de la investigación en plantas medicinales (Shin et al., 2020).

En este estudio se evaluó la toxicidad oral aguda y el efecto farmacológico como protector hepático de dos formulaciones (pre-formulado y microencapsulado) de una BF elaborada a base de extractos de *I. guayusa*, *V. patens* y cascarillas de cacao mediante ensayos *in vivo*. Los hallazgos encontrados en el análisis toxicológico indicaron que la BF es inocua para el organismo en la dosis única de 2000 mg/kg, ya que en el periodo de estudio no se observaron efectos negativos de la BF en los animales tratados con las dos formulaciones por vía oral.

Por otro lado, en el estudio hepatoprotector se observó que la administración de PAT a la dosis de 250 mg/kg causó daño hepático en los ratones experimentales. Esto se reflejó en un incremento de los niveles de las enzimas hepáticas, ALT y AST, medidas en el suero sanguíneo del grupo modelo tóxico. Además, se pudo observar a nivel anatomopatológico e histopatológico, que la dosis tóxica de PAT, generó un daño visible en el hígado con presencia de nódulos fibróticos, hígado de coloración pálida, tumefacción celular, áreas necróticas y presencia de infiltración de células inflamatorias, causando la pérdida de la arquitectura normal de los hepatocitos. Estos hallazgos son similares a los reportados en otros estudios donde se realizó la inducción a daño hepático en ratones experimentales con PAT (Jin et al., 2021; Yuan et al., 2010). Cabe mencionar que lesión hepática aguda inducida por una sobredosis de PAT, se caracteriza por daño y necrosis de los hepatocitos, producido por el estrés oxidativo y procesos inflamatorios generado en el organismo (Dogaru et al., 2020).

En cuanto a el pre-tratamiento de la silimarina, establecido como un control positivo, se observó que la dosis de 200 mg/kg, no presentó efecto hepatoprotector, ya que los niveles enzimáticos fueron similares al grupo modelo tóxico, y en conjunto con los hallazgos encontrados a nivel anatomo e histopatológico se reforzó la carencia del efecto hepatoprotector. En varios estudios se han reportado los efectos positivos de la silimarina para contrarrestar el daño causado por PAT a la dosis referencial de 200 mg/kg (Jin et al., 2021), e inclusive en dosis más bajas de 100 mg/kg, el cual es atribuido a su contenido de compuestos fenólicos (Papackova et al., 2018). Cabe mencionar que la silimarina es un compuesto de naturaleza lipofílica, con escasa o nula

solubilidad en agua, lo que repercute en una absorción intestinal deficiente, afectando su biodisponibilidad oral y limitando su eficacia terapéutica (Piazzini et al., 2019; Yang et al., 2013). Por lo que, en este estudio, se puede asumir que el tratamiento de silimarina no causó protección hepática, debido a que el solvente utilizado para la disolución fue agua destilada, el cual fue el vehículo elegido para el tratamiento de administración vía oral.

Por otro lado, se pudo observar que los pre-tratamientos administrados actuaron de manera dosis dependiente como protectores hepáticos, de manera tal que, el mejor tratamiento que ayudó a aliviar el daño hepático por paracetamol, fue el pre-formulado, cuya mejor dosis fue la dosis baja. Esto fue visible con la reducción de los niveles de las enzimas hepatocelulares ALT y AST. Además, en el análisis macroscópico se observó hígados de apariencia sana similar al grupo control normal, y en conjunto con el análisis histopatológico, se confirmó que las alteraciones patológicas inducidas por el PAT, fueron aliviadas con el pre-formulado. Esto indicó que el tratamiento mencionado, al ser administrado como un tratamiento preventivo, ayudó a atenuar de manera significativa la lesión hepática inducida por PAT en los ratones.

En relación a lo anterior mencionado, el efecto hepatoprotector se puede atribuir a la interacción sinérgica antioxidante de los compuestos bioactivos presentes en la formulación a base de *I. guayusa*, *V. patens* y *T. cacao*, tal como los alcaloides, cafeína y teobromina; y polifenoles, como los ácidos clorogénicos, quercetina y ácido cafeico, mencionados como los principales compuestos de la fórmula de la BF (Quijano-Avilés, 2019; Lyu et al., 2020). Esto coincide con un estudio realizado por Valverde-Zumba (2019), donde se reportó una potente actividad antiinflamatoria de un extracto elaborado a partir de estas tres especies, el cual fue capaz de disminuir el daño ocasionado en la lesión inflamatoria provocada en ratones experimentales.

Por consiguiente, se ha reportado que el cacao es una rica fuente de antioxidantes que ayudan a eliminar los radicales libres (Carta et al., 2020). Los compuestos fenólicos del cacao tal como los flavonoles, ejercen potentes propiedades hepatoprotectoras (Asiedu-Gyekye et al., 2016) Además, se ha reportado en otros estudios que el café, el cual contiene compuestos similares a los componentes de la BF, tal como los ácidos clorogénicos, cafeína y polifenoles, ayuda a reducir el riesgo de padecer enfermedades hepáticas y aliviar la fibrosis (Jeon et al., 2019). Otros estudios también han demostrado que el consumo de café ayuda a reducir los niveles de las enzimas biomarcadores hepáticos como la AST y ALT (Heath et al., 2017). En un estudio pre-clínico realizado por Barroso et al. (2019), se observó que el té de mate (*Ilex paraguariensis*) que pertenece a la misma familia de la guayusa, ayudó a la prevención del daño hepático

actuando como antioxidante en el proceso de estrés oxidativo e inflamatorio generado en ratones.

Respecto al tratamiento de microencapsulado, en los hallazgos encontrados en el análisis de los hígados a nivel macro y microscópico se reportó daños de las células hepáticas, y también se observó una alteración considerable de los niveles enzimáticos, por lo que se considera que este tratamiento no presentó un buen efecto hepatoprotector, pese a estar conformado por la misma formulación del pre-formulado. Esto se puede justificar con el proceso de microencapsulado al cual fue sometida esta formulación. Las altas temperaturas empleadas en el método de secado por aspersión pueden causar la degradación de los compuestos bioactivos sensibles al calor como los compuestos fenólicos (Rahmati et al., 2020; Sepúlveda & Zapata, 2019). Además, en el estudio de Quijano-Avilés (2019) se reportó que el proceso de microencapsulación por secado por aspersión causó una disminución de los compuestos bioactivos y de la actividad antioxidante de la fórmula de la BF.

En definitiva, en los ensayos realizados en el estudio, se determinó que la BF en sus dos formulaciones no causó toxicidad oral aguda a la dosis de 2000 mg/kg en los ratones experimentales. De modo que los parámetros evaluados fueron efectivos para evaluar la toxicidad oral aguda de la bebida. Sin embargo, la limitación de este estudio fue la ausencia de parámetros bioquímicos analizados en sangre que puedan reforzar aún más las conclusiones del estudio.

Por último, en el ensayo hepatoprotector, se observó que el pre-formulado fue el pre-tratamiento que presentó un efecto hepatoprotector significativo contra el daño inducido por PAT, lo cual se demostró a nivel macro y microscópico, y a nivel bioquímico. No obstante, existen carencias que limitan el estudio, tal como la ausencia de otros análisis bioquímicos del perfil hepático, como el análisis de la enzima fosfatasa alcalina (ALP), Gamma-glutamil-transferasa (GGT) y la bilirrubina, que permitan conocer a mayor profundidad el nivel de daño hepático y reforzar el diagnóstico de lesión hepática (Bessone et al., 2021). Además, resulta de interés la comprensión del mecanismo del efecto protector de la BF, mediante el análisis de los niveles de las enzimas biomarcadores antioxidantes del organismo contra el estrés oxidativo, tal como el análisis de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y glutatión peroxidasa (GPx) (Jin et al., 2021; Lin et al., 2019).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En conclusión, la bebida funcional no causó efectos tóxicos en los ratones experimentales tratados con la dosis única de 2000 mg/kg, y de acuerdo al Sistema de Clasificación Globalmente Armonizado (GHS) (United Nations, 2011), la bebida se categorizó como no tóxica ($DL_{50} > 2000$ mg/kg).

Respecto al estudio hepatoprotector, se concluyó que el pre-formulado fue el mejor tratamiento para la prevención del daño hepático inducido por PAT, ayudando a aliviar el daño hepatocelular. Estos resultados sugirieron una potente actividad antioxidante por parte de los compuestos que conforman la bebida, lo que sugiere que tiene un potencial considerable como agente hepatoprotector natural.

Recomendaciones:

- En este estudio se muestra la primera evidencia científica de la ausencia de toxicidad fisiopatológica aguda *in vivo* de una bebida funcional a base de *I. guayusa*, *V. patens* y cascarilla de cacao. Sin embargo, se recomienda llevar a cabo estudios adicionales de toxicidad crónica y subaguda, para fortalecer su uso a largo plazo como bebida segura.
- Se recomienda la ejecución de un ensayo hepatoprotector, con una mayor prolongación de tiempo en lo que respecta a la administración del tratamiento. También, es considerable aumentar el número de unidades experimentales por grupo para reforzar los resultados estadísticos y obtener resultados más firmes. Además, realizar otros ensayos a nivel bioquímico o molecular que permitan estudiar a profundidad como se logra el efecto hepatoprotector de la bebida.

BIBLIOGRAFÍA

- Arteaga-Crespo, Y., Radice, M., Bravo-Sanchez, L. R., García-Quintana, Y., & Scalvenzi, L. (2020). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Ilex guayusa* Loes. leaves using response surface methodology. *Heliyon*, 6(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03043>
- Aidoo, E., Addai, F. K., Ahenkorah, J., Hottor, B., Bugyei, K. A., & Gyan, B. A. (2012). Natural cocoa ingestion reduced liver damage in mice infected with *Plasmodium berghei* (NK65). *Res. rep. trop. med.*, 3, 107–116. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S33149>
- Apolo Arévalo, G., & Rodríguez Saldaña, D. (2021). Efecto de dos niveles de harina de laritaco (*Vernonanthura patens*) sobre la respuesta productiva y morfometría intestinal en pollos de engorde. *Rev. de Investig. Vet. del Perú*, 32(2). <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i2.18385>
- Adhyapok, P., Fu, X., Sluka, J. P., Clendenon, S. G., Sluka, V. D., Wang, Z., Dunn, K., Klaunig, J. E., & Glazier, J. A. (2021). A computational model of liver tissue damage and repair. *Plos One*, 15(12), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243451>
- Arredondo Bruce, A. E., Trujillo Pérez, Y., & Chiong Quesada, M. (2019). Practical use of the laboratory in hepatic diseases. *Rev. Médica Electron.*, 41(5), 1217–1229. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S168418242019000501217&lng=es&tlng=es.
- Aneeshkumar, A. L., Suja, S. N. R., Vilash, V., Nair, R. R., Siril, E. A., & Rajasekharan, S. N. (2018). Sub-chronic oral toxicity assessment (90 days) of ethanolic fraction of leaves of *Neurocalyx calycinus* (R. Br. ex Benn.) Rob. In rodents: A lesser known ethnomedicinal plant from the Cholanaickan tribal community, India. *Interdiscip Toxicol.*, 11(3), 221–235. <https://doi.org/10.2478/intox-2018-0021>
- Al-Afifi, N. A., Alabsi, A. M., Bakri, M. M., & Ramanathan, A. (2018). Acute and sub-acute oral toxicity of *Dracaena cinnabari* resin methanol extract in rats. *BMC Complement Altern Med.*, 18(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-21103>
- Asiedu-Gyekye, I. J., Edem Kukuia, K. K., Seidu, A. M., Antwi-Boasiako, C., N'guessan, B. B., Frimpong-Manso, S., Adjei, S., Zobi, J., Tettey, A. T., & Nyarko, A. K. (2016). Unsweetened Natural Cocoa Powder Has the Potential to Attenuate High Dose Artemether-Lumefantrine-Induced Hepatotoxicity in Non-Malarious Guinea Pigs. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2016, 7387286. <https://doi.org/10.1155/2016/7387286>
- Barišić, V., Jozinović, A., Flanjak, I., Šubarić, D., Babić, J., Milicević, B., Doko, K., & Ackar, D. (2020). Difficulties with use of cocoa bean shell in food production and high voltage electrical discharge as a possible solution. *Sustainability*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/SU12103981>

- Bai, K., Hong, B., He, J., & Huang, W. (2020). Antioxidant capacity and hepatoprotective role of chitosan-stabilized selenium nanoparticles in concanavalin a-induced liver injury in mice. *Nutrients*, *12*(3). <https://doi.org/10.3390/nu12030857>
- Bessone, F., Hernandez, N., Tagle, M., Arrese, M., Parana, R., Mendez-Sánchez, N., Ridruejo, E., Mendizabal, M., Dagher, L., Contreras, F., Fassio, E., Pesoa, M., Brahm, J., & Silva, M. (2021). Drug-induced liver injury: A management position paper from the Latin American Association for Study of the liver. *Annals of Hepatology*, *24*, 100321. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2021.100321>
- Barroso, M. V., Graça-reis, A., & Cattani-cavaliere, I., Gitirana, L. B., Valenca, S. S., & Lanzetti, M. (2019). Biomedicine & Pharmacotherapy Mate tea reduces high fat diet-induced liver and metabolic disorders in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *109*, 1547–1555. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.007>
- Caballero-Serrano, V., McLaren, B., Carrasco, J. C., Alday, J. G., Fiallos, L., Amigo, J., & Onaindia, M. (2019). Traditional ecological knowledge and medicinal plant diversity in Ecuadorian Amazon home gardens. *Glob. Ecol. Conserv.*, *17*. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00524>
- Chen, C., Liu, X., Qi, S., C.P. Dias, A., Yan, J., & Zhang, X. (2020). Hepatoprotective effect of *Phellinus linteus* mycelia polysaccharide (PL-N1) against acetaminophen-induced liver injury in mouse. *Int. J. Biol. Macromol.*, *154*, 1276–1284. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.002>
- Chóez-Guaranda, I., Ruíz-Barzola, O., Ruales, J., & Manzano, P. (2018). Antioxidant activity optimization and GC-MS profile of aqueous extracts of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. leaves. *Nat. Prod. Res.*, *34*(17), 2505-25091. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1539978>
- Chóez-Guaranda, I., García, J., Sánchez, C., Pesantes, C., Flores, J. & Manzano, P. (2019). Identification of lupeol produced by *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. leaf callus culture. *Nat. Prod. Res.*, 1-5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1636239>
- Chóez-Guaranda, I., Viteri-Espinoza, R., Barragán-Lucas, A., Quijano-Avilés, M., & Manzano, P. (2021). Effect of solvent-solvent partition on antioxidant activity and GC-MS profile of *Ilex guayusa* Loes. leaves extract and fractions. *Nat. Prod. Res.*, 1–5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1882455>
- Chóez-Guaranda, I. (2018). *Determinación de las condiciones óptimas de extracción de compuestos antioxidantes de hojas de Vernonanthura patens (Kunth) H. Rob.* [Tesis de maestría]. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador.
- Coronado H., M., Vega Y León, S., Gutiérrez T., R., Marcela, V. F., & Radilla V., C. (2015). Antioxidantes: Perspectiva actual para la salud humana. *Rev. Chil. Nutr.*, *42*(2), 206–212. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Carta, S., Nudda, A., Cappai, M. G., Lunesu, M. F., Atzori, A. S., Battacone, G., & Pulina, G. (2020). Short communication: Cocoa husks can effectively replace soybean hulls in dairy sheep diets—Effects on milk production traits and hematological parameters. *Int. J. Dairy Sci.*, *103*(2), 1553–1558. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17550>

- Derkyi, N. S. A., Acheampong, M. A., Mwin, E. N., Tetteh, P., & Aidoo, S. C. (2018). Product design for a functional non-alcoholic drink. *S. Afr. J. Chem. Eng.*, *25*, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2018.02.002>
- Dogaru, G., Bulboaca, A. E., Gheban, D., Boarescu, P. M., Rus, V., Festila, D., Sitar-Taut, A. V., & Stanescu, I. (2020). Effect of liposomal curcumin on acetaminophen hepatotoxicity by down-regulation of oxidative stress and matrix metalloproteinases. *In Vivo*, *34*(2), 569–582. <https://doi.org/10.21873/invivo.11809>
- Du, D., Lv, W., Jing, X., Ma, X., Wuen, J., & Hasi, S. (2021). Dietary supplementation of camel whey protein attenuates heat stress-induced liver injury by inhibiting NLRP3 inflammasome activation through the HMGB1/RAGE signalling pathway. *J. Funct. Foods*, *84*, 104584. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104584>
- Durán A, S., Cordón A, K., & Rodríguez N, M. (2013). Edulcorantes no nutritivos, riesgos, apetito y ganancia de peso. *Rev. chil. nutr.*, *40*(3), 309–314. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000300014>
- Elufioye, T. O., & Habtemariam, S. (2019). Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action. *Biomed. Pharmacother.*, *112*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108600>
- European Commission. (2019). *Legislation for the protection of animals used for scientific purposes*. Retrieved on August 15, 2019 from https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm
- Fuentes Berrio, L., Acevedo Correa, D., & Gelvez Ordoñez, V. M. (2015). Functional foods: impact and challenges for development and welfare society colombian. *Biotechnol. Sector Agropecuario Agroind.*, *13*(2), 140. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(13\)140-149](https://doi.org/10.18684/bsaa(13)140-149)
- González-Ponce, H. A., Martínez-Saldaña, M. C., Rincón-Sánchez, A. R., Sumaya-Martínez, M. T., Buist-Homan, M., Faber, K. N., Moshage, H., & Jaramillo-Juárez, F. (2016). Hepatoprotective effect of *Opuntia robusta* and *Opuntia streptacantha* fruits against acetaminophen-induced acute liver damage. *Nutrients*, *8*(10). <https://doi.org/10.3390/nu8100607>
- Gan, R.-Y., Zhang, D., Wang, M., & Corke, H. (2018). Health Benefits of Bioactive Compounds from the Genus *Ilex*, a Source of Traditional Caffeinated Beverages. *Nutrients*, *10*(11), 1682. <https://doi.org/10.3390/nu10111682>
- Hernández-Hernández, C., Fernández-Cabanás, V. M., Rodríguez-Gutiérrez, G., Fernández-Prior, Á., & Morales-Sillero, A. (2022). Rapid screening of unground cocoa beans based on their content of bioactive compounds by NIR spectroscopy. *Food Control*, *131*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108347>
- Hazarika, I., Geetha, K. M., Sundari, P. S., & Madhu, D. (2019). Acute oral toxicity evaluation of extracts of *Hydrocotyle sibthorpioides* in wister albino rats as per OECD 425 TG. *Toxicol. Rep.*, *6*, 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.04.001>
- Heath, R. D., Brahmabhatt, M., Tahan, A. C., Ibdah, J. A., & Tahan, V. (2017). Coffee: The magical bean for liver diseases. *World journal of hepatology*, *9*(15), 689–696. <https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i15.689>

- Jin, S. E., Shin, H.-K., & Ha, H. (2021). Hepatoprotective effects of Gamisoyo-san against acetaminophen-induced liver injuries. *Integr. Med. Res.*, *10*(1), 100466. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2020.100466>
- Jeon, J. S., Kim, H. T., Jeong, I. H., Hong, S. R., Oh, M. S., Yoon, M. H., Shim, J. H., Jeong, J. H., & Abd El-Aty, A. M. (2019). Contents of chlorogenic acids and caffeine in various coffee-related products. *Journal of Advanced Research*, *17*, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.01.002>
- Kluxen, F. M., Weber, K., Strupp, C., Jensen, S. M., Hothorn, L. A., Garcin, J. C., & Hofmann, T. (2021). Using historical control data in bioassays for regulatory toxicology. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, *125*, 105024. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.105024>
- Kweon, M., Kim, J. Y., Jun, J. H., & Kim, G. J. (2020). Research Trends in the Efficacy of Stem Cell Therapy for Hepatic Diseases Based on MicroRNA Profiling. *Int. J. Mol. Sci.*, *22*(1), 239. <https://doi.org/10.3390/ijms22010239>
- Lee, Y. S., Cho, I. J., Kim, J. W., Lee, M. K., Ku, S. K., Choi, J. S., & Lee, H. J. (2019). Hepatoprotective effects of blue honeysuckle on CCl₄-induced acute liver damaged mice. *Food Sci. Nutr.*, *7*(1), 322–338. <https://doi.org/10.1002/fsn3.893>
- Li, G., Yang, Y., Yang, J., Suo, Y., Xu, H., Liu, P., Wang, J., Deng, G., & Feng, T. (2021). Hepatoprotective effects of Malus hupehensis tea against isoniazid- and rifampicin-induced liver injury by regulating cytochrome P450 in mice. *J. Funct. Foods*, *84*, 104580. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104580>
- Li, C., Wang, Z., Li, G., Wang, Z., Yang, J., Li, Y., Wang, H., Jin, H., Qiao, J., Wang, H., Tian, J., Lee, A. W., & Gao, Y. (2020). Acute and repeated dose 26-week oral toxicity study of 20(S)-ginsenoside Rg₃ in Kunming mice and Sprague–Dawley rats. *J. Ginseng Res.*, *44*(2), 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2018.10.001>
- Lin, L., Guan, H., Li, R., Liao, X., Zhao, F., Wang, M., Li, J., Xu, G., He, X., Zhang, J., Li, Y., Wang, Y., Zhou, M., & Liao, S. (2019). Auriculatone Sulfate Effectively Protects Mice Against Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Molecules*, *24*(20), 3642. <https://doi.org/10.3390/molecules24203642>
- Lyu, J. I., Ryu, J., Jin, C. H., Kim, D. G., Kim, J. M., Seo, K. S., Kim, J. B., Kim, S. H., Ahn, J. W., Kang, S. Y., & Kwon, S. J. (2020). Phenolic Compounds in Extracts of *Hibiscus acetosella* (Cranberry Hibiscus) and Their Antioxidant and Antibacterial Properties. *Molecules*, *25*(18), 4190. <https://doi.org/10.3390/molecules25184190>
- Manzano Santana, P., Quijano-Avilés, M., Chóez-Guaranda, I., Barragán Lucas, A., Viteri Espinoza, R., Martínez, D., Camacho, C., & Miranda Martínez, M. (2018). Effect of drying methods on physical and chemical properties of *Ilex guayusa* leaves. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, *71*(3), 8617–8622. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v71n3.71667>
- Manzano, P. I., Miranda, M., Quijano, M. F., & Monzote, L. (2015). Advances in Studies of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. Growing in Ecuador. In *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health.*, Rao A. V. (Ed.), IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/59866>

- Manzano Santana, P., Orellana León, T., Miranda Martínez, M., Abreu Payrol, J., Ruíz, O., & Peralta García, E. L. (2013). Algunos parámetros farmacognósticos de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. (Asteraceae) endémica de Ecuador. *Rev. Cuba. de Plantas Medicinales*, 18(1), 131-139. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962013000100015&lng=es&tlng=es.
- Manzano, P.I., Miranda, M., Gutiérrez, Y., Santos, E., & Scull, R. (2014). Estudio morfo-anatómico e identificación genética de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. *J. Pharm. Pharmacogn. Res.*, 2(5), 119-128. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=496050270002>
- Magistrelli, D., Malagutti, L., Galassi, G., & Rosi, F. (2012). Cocoa husks in diets of Italian heavy pigs. *Anim. Sci. J.*, 90, 230–232. <https://doi.org/10.2527/jas.53970>
- Martínez-Ángel, J. D., Villamizar-Gallardo, R. A., & Ortiz-Rodríguez, O. O. (2015). Caracterización y evaluación de la cáscara de mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L.) como fuente de energía renovable. *Agrociencia*, 49(3), 329–345. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405319520150003000008&lng=es&tlng=.
- Manzano, P., Hernández, J., Quijano-Avilés, M., Barragán, A., Chóez-Guaranda, I., Viteri, R., & Valle, O. (2017). Polyphenols extracted from *Theobroma cacao* waste and its utility as antioxidant. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(1), 45–50. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-04-388>
- Mata, C., Pestana, C., Lares, M., Porco, A., Giacomini, M. I., Brito, S., & Castro, J. (2016). Relación entre la ingesta de antioxidantes, factores nutricionales e indicadores bioquímicos en voluntarios sanos. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 656(3), 201210. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004062220160003000006&lng=es&nrm=iso.
- Martínez-Hidalgo, M. P. V. (2007). Alternatives to animal experimentation in toxicology: present situation. *Acta Bioeth.*, 13(1), 41–52. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=35215136&lang=es&site=ehost-live>
- McGill, M. R., & Jaeschke, H. (2019). Animal models of drug-induced liver injury. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.*, 1865(5), 1031–1039. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.037>
- Nystrand, B. T., & Olsen, S. O. (2020). Consumers' attitudes and intentions toward consuming functional foods in Norway. *Food Qual. Prefer.*, 80, 103827. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2019.103827>
- National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research. (n.d.). *The 3Rs*. <https://nc3rs.org.uk/the-3rs#reduction>
- Ng'uni, T., Klaasen, J. A., & Fielding, B. C. (2018). Acute toxicity studies of the South African medicinal plant *Galenia africana*. *Toxicol. Rep.*, 5, 813–818. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.08.008>
- Orellana-Manzano, A., Orellana-Manzano, S., Dorado Sanchez, L., Vizcaino, M.J., Gomez-Franco, F., & Chuquimarca-Tandazo, L. (2021). Self-Medication Risk

- During SARS-COV-2 Confinement Pandemic. *TheFasebJournal*.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.2021.35.S1.04814>
- Organization of Economic Cooperation and Development. (2001). *Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*.
https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/fedddocs/oecd/oecd_gl420.pdf
- Organization of Economic Cooperation and Development. (2000). *Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*.
https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/fedddocs/oecd/oecd_gl19.pdf
- Panak Balentić, J., Ačkar, Đ., Jokić, S., Jozinović, A., Babić, J., Miličević, B., Šubarić, D., & Pavlović, N. (2018). Cocoa Shell: A By-Product with Great Potential for Wide Application. *Molecules*, 23(6), 1-14.
<https://doi.org/10.3390/molecules23061404>
- Papackova, Z., Heczkova, M., Dankova, H., Sticova, E., Lodererova, A., Bartonova, L., Poruba, M., & Cahova, M. (2018). Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *PLoS One*, 13(1), 1-20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191353>
- Piazzini, V., D'Ambrosio, M., Luceri, C., Cinci, L., Landucci, E., Bilia, A. R., & Bergonzi, M. C. (2019). Formulation of nanomicelles to improve the solubility and the oral absorption of silymarin. *Molecules*, 24(9), 1-20.
<https://doi.org/10.3390/molecules24091688>
- Quijano-Avilés, M.F. (2019). *Desarrollo de un microencapsulado nutracéutico con actividad antioxidante a base de extractos de Ilex guayusa, Vernonanthurra patens y cascarilla de cacao* [Tesis de maestría no publicada]. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador.
- Rosales-Rivadeneira, S., Álvarez-Moreno, M., & Tito-Pineda, P. (2017). Indigenous Cosmovision About Health and Illness in Otavalo - Ecuador. *Procedia Soc. Behav. Sci.*, 237, 975-979. <https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2017.02.138>
- Ren, X., Xin, L. T., Zhang, M. Q., Zhao, Q., Yue, S. Y., Chen, K. X., Guo, Y. W., Shao, C. L., & Wang, C. Y. (2019). Hepatoprotective effects of a traditional Chinese medicine formula against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in vivo and in vitro. *Biomed. Pharmacother.*, 117, 109190.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109190>
- Rajo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Zeppa, G., & Stévigny, C. (2020). Cocoa Bean Shell-A By-Product with Nutritional Properties and Biofunctional Potential. *Nutrients*, 12(4), 1123. <https://doi.org/10.3390/nu12041123>
- Radice, M., Scalvenzi, L., & Sablón Cossio, N. (2017). *Ilex guayusa*: A systematic review of its Traditional Uses, Chemical Constituents, Biological Activities and Biotrade Opportunities. In: Proceedings of MOL2NET, International Conference on Multidisciplinary Sciences, Second edition, 3868. *MDPI*.
<https://doi.org/10.3390/mol2net-02-03868>
- Rojas-Armas, J. P., Arroyo-Acevedo, J. L., Ortiz-Sánchez, J. M., Palomino-Pacheco, M., Hilario-Vargas, H. J., Herrera-Calderón, O., & Hilario-Vargas, J. (2019).

- Potential Toxicity of the Essential Oil from *Minthostachys mollis*: A Medicinal Plant Commonly Used in the Traditional Andean Medicine in Peru. *J. Toxicol.* <https://doi.org/10.1155/2019/1987935>
- Rigamonti, A. E., Leoncini, R., Casnici, C., Marelli, O., De Col, A., Tamini, S., Lucchetti, E., Cicolini, S., Abbruzzese, L., Cella, S. G., & Sartorio, A. (2019). Whey proteins reduce appetite, stimulate anorexigenic gastrointestinal peptides and improve glucometabolic homeostasis in young obese women. *Nutrients*, *11*(2). <https://doi.org/10.3390/nu11020247>
- Ríos-López, D. G., Aranda-López, Y., Sosa-Garrocho, M., & Macías-Silva, M. (2020). La plasticidad del hepatocito y su relevancia en la fisiología y la patología hepática. *TIP Rev. Espec. Cienc. Quim. Biol.*, *23*, 1–19. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.225>
- Rahmati, E., Sharifian, F., & Fattahi, M. (2020). Process optimization of spray-dried Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract powder. *Food Sci. Nutr.*, *8*(12), 6580–6591. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1949>
- Segura-Badilla, O., Lazcano-Hernández, M., Kammar-García, A., Vera-López, O., Aguilar-Alonso, P., Ramírez-Calixto, J., & Navarro-Cruz, A. R. (2020). Use of coconut water (*Cocus nucifera* L) for the development of a symbiotic functional drink. *Heliyon*, *6*(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03653>
- Saleem, U., Amin, S., Ahmad, B., Azeem, H., Anwar, F., & Mary, S. (2017). Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of *Saccharum munja* Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG. *Toxicol. Rep.*, *4*, 580–585. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.10.005>
- Shin, S., Yi, J. M., Kim, N. S., Chan-Sung Park, Kim, S. H., & Ok-Sun Bang. (2020). Aqueous extract of *Forsythia viridissima* fruits: Acute oral toxicity and genotoxicity studies. *J. Ethnopharmacol.* *249*, 112381. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112381>
- Sangronis, E., Soto, M. J., Valero, Y., & Buscema, I. (2014). Cascarilla de cacao venezolano como materia prima de infusiones. *Arch. Latinoam. Nutr.*, *64*(2), 123–130. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000406222014000200007&lng=es&tlng=.](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000406222014000200007&lng=es&tlng=)
- Solari G., S., & Ríos B., J. C. (2009). ¿Cuál es la utilidad clínica de un estudio toxicológico? *Rev. Med. Chil.*, *137*(10), 1395–1399. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872009001000018>
- Sepúlveda, C. T., & Zapata, J. E. (2019). Efecto de la Temperatura, el pH y el Contenido en Sólidos sobre los Compuestos Fenólicos y la Actividad Antioxidante del Extracto de *Bixa orellana* L. *Inf. Tecnol.*, *30*(5), 57–66. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642019000500057>
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2018). The liver. *Curr. Biol.* *27*(21). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
- Tsai, W. C., Chang, H. C., Tseng, Y. H., Yin, H. Y., Liao, J. W., Agrawal, D. C., & Wen, H. W. (2020). Toxicity evaluation of water extract of tissue-cultured

- Taraxacum formosanum* by acute, subacute administration, and Ames test. *Electron. J. Biotechnol.*, 45, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.04.001>
- Ullman-Culleré, M. H., & Foltz, C. J. (1999). Body condition scoring: A rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Lab. Anim. Sci.*, 49(3), 319–323.
- United Nations. (2011). *Economic Commission for Europe. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*. https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/English/ST-SG-AC10-30-Rev4e.pdf
- Valverde-Zumba, L. P. (2019). *Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos acuosos combinados de Ilex guayusa (Loes), Vernonanthurra patens (Kunth) y Theobroma cacao (Linneo) en modelo animal rata (Rattus norvegicus)* [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/9712>
- World Health Organization (2019). *Global report on traditional and complementary medicine*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/312342>
- Worasuttayangkurn, L., Nakareangrit, W., Kwangjai, J., Sritangos, P., Pholphana, N., Watcharasit, P., Rangkadilok, N., Thiantanawat, A., & Satayavivad, J. (2019). Acute oral toxicity evaluation of *Andrographis paniculata*-standardized first true leaf ethanolic extract. *Toxicol. Rep.*, 6, 426–430. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.05.003>
- Xie, W., Wang, M., Chen, C., Zhang, X., & Melzig, M. F. (2016). Hepatoprotective effect of isoquercitrin against acetaminophen-induced liver injury. *Life Sci.*, 152, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.04.002>
- Yang, K. Y., Hwang, D. H., Yousaf, A. M., Kim, D. W., Shin, Y. J., Bae, O. N., Kim, Y. Il, Kim, J. O., Yong, C. S., & Choi, H. G. (2013). Silymarin-loaded solid nanoparticles provide excellent hepatic protection: Physicochemical characterization and *in vivo* evaluation. *Int. J. Nanomedicine*, 8, 3333–3343. <https://doi.org/10.2147/IJN.S50683>
- Yuan, H. D., Jin, G. Z., & Piao, G. C. (2010). Hepatoprotective effects of an active part from *Artemisia sacrorum* Ledeb. against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(2), 528–533. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.10.002>

ANEXOS

ANEXO A. Certificado otorgado por el comité de ética en el uso de animales de investigación y docencia de la Universidad de San Francisco de Quito (No. 2019-017b).



Quito, 19 de marzo de 2021

OFICIO: 2019-017b

Q.F. Geovanna Paladines Santacruz - Estudiante de maestría en Biociencias de la ESPOL - Tesista
Andrea Orellana Manzano, PhD. - Departamento para investigaciones biomédicas de la ESPOL - Tutor del proyecto
Fausto Zaruma Torres, PhD. - Universidad de Cuenca - Cotutor del proyecto
Johana Ortíz, PhD. - Universidad de Cuenca - Asesora del proyecto
Glenda Sarmiento, Msc. - Universidad de Guayaquil - Asesora del proyecto
Patricia Manzano Santana, PhD. - Departamento de bioproductos de la ESPOL - Asesora del proyecto
 Presente.-

Estimados investigadores:

Por medio de la presente, tengo a bien informarle que se ha procedido a la **reevaluación** de su proyecto de investigación titulado "**Toxicidad oral aguda y efecto hepatoprotector de una bebida funcional a base de *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens* y cascarilla de cacao en modelo murino**", proyecto que ha sufrido retrasos por causa de la pandemia COVID-19 y las restricciones de circulación y trabajo grupal implementadas por el COE desde el 13 de marzo de 2020.

Una vez examinado el caso y en virtud de que la reevaluación es motivada a cambios en el cronograma y no en los aspectos metodológicos aprobados en el oficio 2019-017⁹, se ha decidido **entender por un año la validez del aval previamente otorgado al mencionado proyecto**. Ya que el proyecto involucra el estudio de muestras biológicas, se recomienda seguir al pie de la letra las normas de bioseguridad de los laboratorios involucrados.

Así mismo, se recuerda que este aval **cubre únicamente los aspectos relacionados con el respeto a los principios y normativas vigentes acerca del bienestar animal en la investigación y docencia, tal como se redactaron en el protocolo aprobado**. Si usted incumple o cambia sin previo aviso cualquier aspecto de su diseño experimental de manera que afecte las Normas y Recomendaciones arriba mencionadas, el aval se considerará nulo. Otros cambios en el diseño metodológico no anulan este aval por no corresponder a las competencias de este comité.

Sin otro particular al cual hacer referencia, y deseándole todo el éxito posible, me despido,

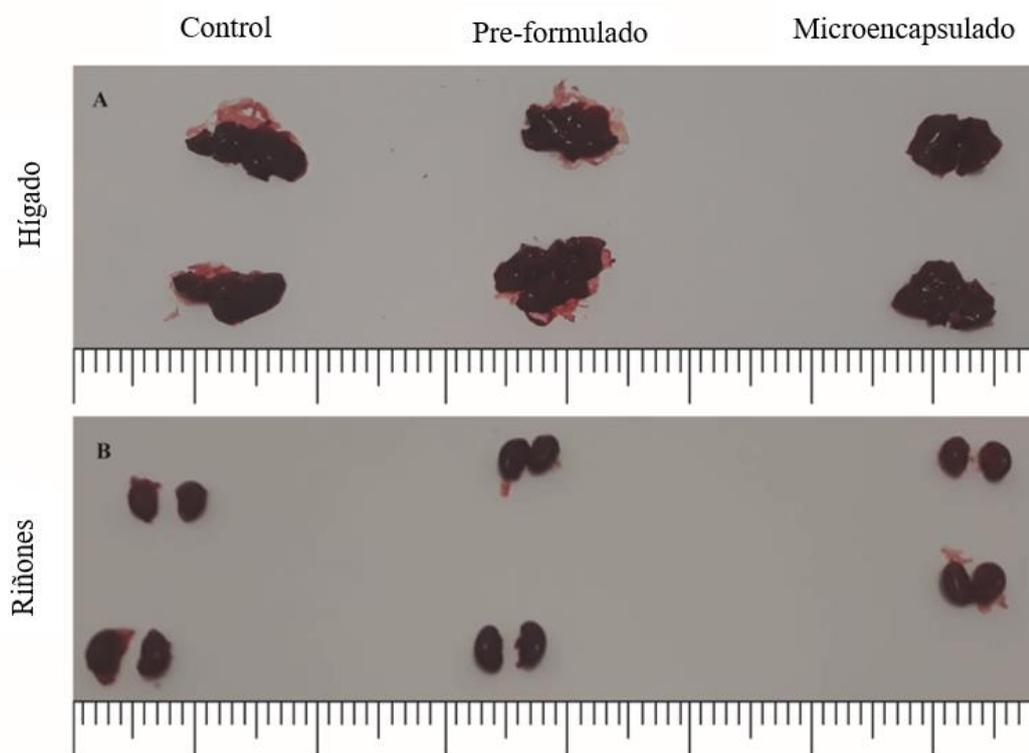
Atentamente,

Firma el 19/03/2021

Francisco Cabrera
 Presidente

Comité de Ética en el Uso de Animales en Investigación y Docencia de la USFQ

ANEXO B. Observación macroscópica del tamaño de hígado (A) y los riñones (B) en el estudio de toxicidad oral aguda. Comparación entre el grupo control, pre-formulado (2000 mg/kg) y microencapsulado (2000 mg/kg).



ANEXO C. Artículo del estudio de toxicidad oral aguda publicado en la revista Toxicology Reports.

Toxicology Reports 8 (2021) 747–752



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Toxicology Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxrep



Acute oral toxicity of a novel functional drink based on *Ilex guayusa*, *Vernonanthura patens*, and cocoa husk

Geovanna Paladines-Santacruz^{a,1}, Andrea Orellana-Manzano^{a,f,*1}, Glenda Sarmiento^b, Glenda Pilozo^{b,e}, Elsy Iníga^b, Fausto Zaruma-Torres^c, Johana Ortíz-Ulloa^d, María Quijano-Avilés^e, Davide Di Grumo^f, Silvia Orellana-Manzano^f, María del Carmen Villacrés^b, Patricia Manzano^e, Wim Vanden Berghe^g

^a ESPOL Polytechnic University, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Laboratorio para investigaciones biomédicas, Facultad de Ciencias de la vida (FCV), Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

^b Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Guayaquil, Cda. Universitaria "Salvador Allende", Malecón del Salado entre Av. Delta y Av. Kennedy, 090514, Guayaquil, Ecuador

^c Laboratorio de Proteínas y Farmacología, Universidad de Cuenca, Av. 12 de abril y Av. Loja, 010203, Cuenca, Ecuador

^d Departamento de Biociencias. Grupo "Alimentación, Nutrición y Salud", Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca, Av. 12 de abril y Av. Loja, 010203, Cuenca, Ecuador

^e ESPOL Polytechnic University, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

^f Universidad Espíritu Santo, Samborondón, Ecuador

^g University of Antwerp, PPES, Epigenetic Signaling Lab, Faculty Biomedical Sciences, Prinsstraat 13, 2000, Wilrijk, Antwerp, Belgium