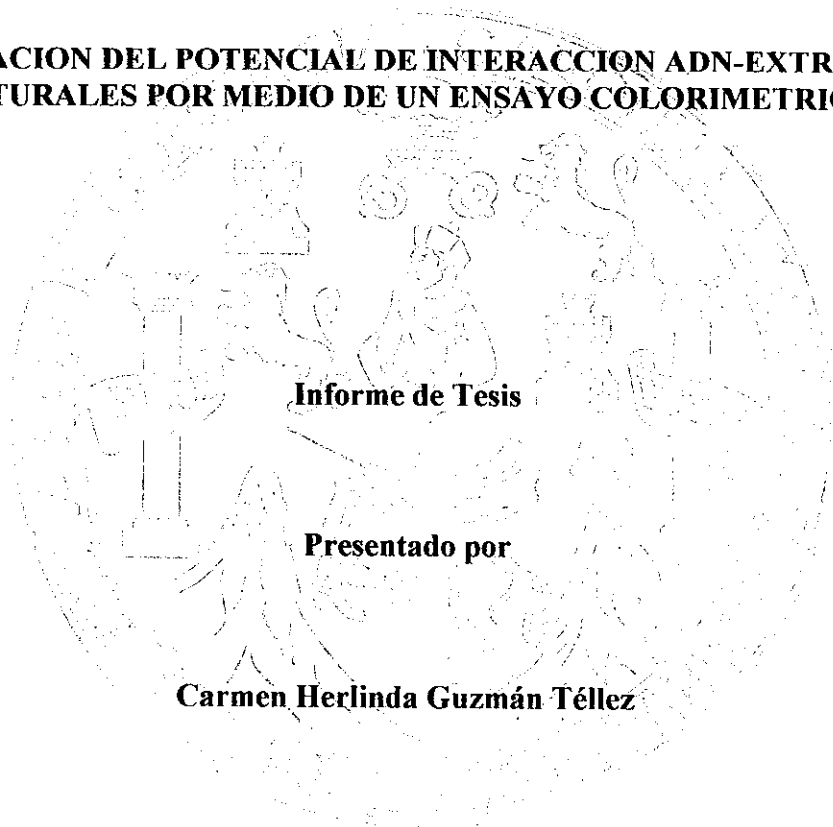


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**EVALUACION DEL POTENCIAL DE INTERACCION ADN-EXTRACTOS
NATURALES POR MEDIO DE UN ENSAYO COLORIMETRICO**



Informe de Tesis

Presentado por

Carmen Herlinda Guzmán Téllez

para optar al título de

Químico Biólogo

Guatemala, noviembre de 1997



06
T(1859)
C.A

JUNTA DIRECTIVA

DECANO	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
SECRETARIO	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
VOCAL IV	BR. HERBERT RAUL AREVALO ALVARADO
VOCAL V	BR. MANOLA ANLEU FORTUNY

DEDICO ESTA TESIS

A DIOS

Por estar siempre conmigo, por amarme y bendecirme.

A MI MADRE

Carmen Aída Téllez, por ser mi ejemplo de fortaleza.

A MIS HERMANOS

Silvia, Julio César, Gustavo y Sarita, gracias por ser valientes y hacer cierto eso de que la unión hace la fuerza.

A MI ESPOSO

Carlos Enrique Schottler, por su amor y paciencia.

A FAMILIAS

Monzón Guerra
Monzón Schottler
Schottler Alvarez
Gracias por ser personas tan especiales.

A MI AMIGO

Jorge Mario Monzón, por recordarme el valor de una amistad verdadera.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Al Doctor Rubén Velásquez por las revisiones efectuadas al presente trabajo de investigación.

Al Lic. Gerardo Arroyo Catalán, MSc., por su apoyo.

Al Lic. Armando Cáceres Estrada por asesorar el trabajo de tesis y filosofar conmigo

A las señoras Eugenia Garzaro y Lucy Santis por su colaboración.

INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	4
3.1 Importancia del uso de plantas medicinales en Guatemala	4
3.2 Etnofarmacología de las plantas utilizadas	4
3.3 Evaluación de toxicidad	13
4. Justificaciones	22
5. Objetivos	23
6. Hipótesis	24
7. Materiales y métodos	25
8. Resultados	31
9. Discusión de resultados	38
10. Conclusiones	40
11. Recomendaciones	41
12. Bibliografía	42
13. Anexos	49

1. RESUMEN

En Guatemala las plantas medicinales son de amplio uso popular, por lo que en la actualidad han llamado la atención de investigadores que han dedicado su esfuerzo a la determinación de las actividades farmacológicas que poseen, pero existen muy pocos estudios encaminados a la detección de posibles efectos secundarios y citotoxicidad que puedan presentar.

En este trabajo de investigación se utilizó un microensayo colorimétrico para la evaluación del potencial de interacción con el ADN de cinco extractos de vegetales usados en la medicina popular guatemalteca. El microensayo colorimétrico es un ensayo utilizado para la detección de agentes que interactúan con el ADN teniendo actividad de ADNasa, utiliza como sustrato un complejo formado por ADN y el colorante 4-[p-(dimetil amino)- α -[p-(dimetilaminofenil)] benziliden] 2, 5- ciclohexadieno-1- iliden] dimetilamonio cloro etobromuro, también conocido como verde de metilo (VM). La actividad de ADNasa presente en compuestos químicos o extractos naturales, se pone en evidencia por una disminución de la absorbancia, la cual es causada por la liberación del VM del complejo ADN/VM, lo que provoca la formación de carbinol, un compuesto incoloro.

Los extractos vegetales analizados fueron *Annona reticulata* (anona), *Byrsonima crassifolia* (nance), *Psidium guajava* (guayaba), *Simarouba glauca* (aceituno) y *Tecoma stans* (timboco). De los cinco extractos sólo *A. reticulata* presentó una actividad potencial de ADNasa.

2. INTRODUCCION

El uso de plantas medicinales en Guatemala, es parte de la cultura que desde tiempos inmemorables nos ha sido legada. Nuestros antepasados mayas las utilizaban para el tratamiento de diversas afecciones (1), aunque su uso era en forma empírica. Actualmente existen en nuestro país varias investigaciones científicas sobre plantas que han demostrado su acción biocida contra agentes infecciosos, pero no se le ha dado importancia a la determinación de los probables efectos secundarios y citotoxicidad que puedan presentar. Sobre todo en plantas que la población utiliza por tiempos prolongados.

Se conoce que algunos compuestos químicos utilizados como medicamento, causan alteraciones que van desde cambios metabólicos y destrucción celular hasta alteraciones genéticas. También se tiene conocimiento sobre estudios realizados con plantas medicinales que han demostrado que poseen actividad mutagénica (2,3).

Existen varias pruebas que pueden ser utilizadas para evaluar los posibles efectos tóxicos *in vitro* de químicos o productos naturales, entre ellas *Artemia salina* que permite determinar citotoxicidad debido a la gran susceptibilidad que los nauplios de este crustaceo presentan al ser expuestos a sustancias químicas de extractos vegetales (4). Otra de las pruebas utilizadas es la prueba Ames cuya finalidad es evaluar el potencial mutagénico de los compuestos químicos y productos naturales por medio de la reversión de la característica histidina dependiente que posee la cepa de *Salmonella typhimurium* que se usa (5).



Otra forma de medir toxicidad es el daño producido en el ácido desoxirribonucleico celular (ADN), como por ejemplo la intercalación de segmentos ajenos al ADN original. Para evaluarlo se puede utilizar un microensayo colorimétrico para la detección de agentes que interactúan contra el ADN teniendo actividad de ADNasa, actividad con la cual se podría esperar que en determinadas condiciones llegaran a hacer intercalaciones de segmentos de ADN interfiriendo con todo el aparato genético celular (6).

En la presente investigación se determinó la potencial interacción con el ADN que presentan cinco extractos vegetales de plantas utilizados en la medicina popular guatemalteca, siendo estas *Annona reticulata* (anona), *Byrsonima crassifolia* (nance), *Psidium guajava* (guayaba), *Simarouba glauca* (aceituno) y *Tecoma stans* (timboco).

3. ANTECEDENTES

3.1 Importancia del uso de plantas medicinales en Guatemala

La población guatemalteca recurre al uso de plantas medicinales basada en la experiencia empírica existente sobre su actividad contra la sintomatología de diversas afecciones, además es una medicina de menor costo, mayor accesibilidad y que resulta ser eficaz y segura.

Por otra parte, por ser de origen natural se tiene la creencia que pueden ser utilizadas, aún por tiempos prolongados, sin causar ningún efecto secundario adverso.

Basados en el uso generalizado de plantas medicinales se han realizado en nuestro país varias investigaciones científicas que han demostrado su actividad biocida y farmacológica. Con ello el conocimiento de muchas de las plantas utilizadas en forma popular ha dejado de ser empírico (7).

3.2 Etnofarmacología de las plantas utilizadas

3.2.1 Familia Annonaceae

3.2.1.2 *Annona reticulata* L.

3.2.1.2.1 Nombres vulgares: Mamón, Cachimán, Anona.

3.2.1.2.2 Descripción botánica y habitat:

Arbol de 8-12 m, hojas oblongo-lanceoladas a lanceoladas, de 8-20 cm, aguadas a acuminadas; flores con sépalos redondeado-trianguares, de 1.5-2.5 cm, fruto subgloboso, de 8-12 cm, casi liso, algo areolado, la pulpa amarillenta y dulce. Se encuentra en regiones tropicales, originaria de América tropical (8).

3.2.1.2.3 Usos etnomédicos:

La decocción de las hojas con sal, por vía oral, se utiliza para aliviar el dolor abdominal, flatulencia, vómitos, úlcera y como antidiarréico. El fruto machacado se utiliza para cicatrizar llagas y heridas, la decocción de su corteza se utiliza como antidiarréico y antiulceroso. La raíz se utiliza como un agente antiepiléptico (8).

3.2.1.2.4 Composición química:

La planta entera es rica en taninos y contiene una resina con propiedades insecticidas, además de ello se determinó la presencia de dopamina; el fruto es rico en elementos nutritivos como vitaminas, proteínas y magnesio. La hoja contiene sesquiterpenos y compuestos fenólicos y acetogeninas que confieren la propiedad insecticida (8).

3.2.1.2.5 Farmacología:

La búsqueda de una actividad depresiva central se realiza en el ratón por medio de dos métodos: la reacción psicogalvánica y la prueba del hábito. La reacción psicogalvánica corresponde a un aumento de la conducción eléctrica palmar seguida de una estimulación (estímulo luminoso). La intensidad de esta reacción disminuye y luego se anula gracias a una sollicitación monótona



de fotoestímulos repetitivos y, en esas condiciones, se produce un hábito. Los estimulantes centrales retardan ese hábito, mientras que los depresores del sistema nervioso central lo aceleran (10).

A dosis inferiores o iguales a 2.5 g/kg por vía intraperitoneal en ratón, *A. reticulata* L. no muestra ninguna actividad sedante. Sin embargo a dosis de 0.1 mg/kg se observa una ligera pero significativa acción retardadora del hábito correspondiente a un efecto estimulante. La planta no presenta ninguna actividad antimicrobiana contra enterobacterias responsables de las principales infecciones intestinales (9), es activa contra *Streptococcus pneumoniae* en extracto alcohólico (10). Además las hojas poseen actividad insecticida (8).

3.2.2 Familia Bignoniaceae

3.2.2.1 *Tecoma stans* Juss. ex HBK.

3.2.2.1.1 Nombres vulgares: Timboco, Barreto, Chacté, Flor Amarilla, San Andrés, Timboque, Trompeta, Tronadora.

3.2.2.1.2 Descripción botánica y habitat:

Arbol de 12 m de alto, tronco de 25 cm de diámetro, erecto, ramas cayentes. Hojas deciduas, opuestas 20 cm de largo, compuestas, 5-13 foliolos, lanceolados u ovados, 4-10 cm de largo, puntiagudos, dentados. Inflorescencia terminal en racimo o panícula con muchas flores olorosas, amarillas, acampanadas, 3-5 cm de largo, 5 lóbulos recurvados. Vaina oblonga, en punta, 10-25 cm de largo, formando grupos, se abre al madurar. Semillas



numerosas, pequeñas, delgadas, café claro, aladas (11, 12). Nativo de México, Centro y Sur América en matorrales, laderas rocosas abiertas, bosque seco subtropical y monte espinoso hasta 1,500 msnm (12).

3.2.2.1.3 Usos etnomédicos:

Las ramas frescas se venden en los mercados con fines medicinales (13). El cocimiento de hojas y corteza se usa por vía oral para tratar afecciones gastrointestinales (12), diabetes (11, 13), dolor de cabeza, edema enfermedades renales (11), paludismo (14), reumatismo (15) y sífilis (12). El cocimiento de la raíz se toma para tratar afecciones digestivas y molestias del estómago (16). La infusión de hojas se aplica tópicamente en forma de baños y lavados para aliviar el dolor de cuerpo, edema, fiebre, piernas hinchadas, hemorroides y reumatismo (12).

3.2.2.1.4 Composición química:

Las hojas contienen alcaloides, triterpenoides, resinas, cera, aceite esencial, sales minerales, grasa, taninos (12), azúcares (17), flavonoides, glucósidos iridoides, monoterpenos y lapachol (18). La corteza contiene alcaloides, glicósidos saponínicos, sesquiterpenlactonas, taninos y triterpenos; la raíz contiene alcaloides, sesquiterpenlactonas, taninos y triterpenos (12).

3.2.2.1.5 Farmacología:

Estudios antibacterianos demuestran que el extracto etanólico de corteza es activo contra *Staphylococcus aureus*, pero es inactivo contra *Escherichia coli*; los extractos acuoso y etanólico de hojas fueron inactivos contra ambas bacterias (19). Estudios para comprobar el uso como antidiabético demuestran que las hojas por vía oral e intraperitoneal tienen efecto hipoglucémico en ratas aloxanizadas (14). El extracto fresco, la decocción y el

extracto alcohólico de tallos mejoran la tolerancia a la glucosa en ratas y reducen los niveles de glucosa en ayunas en conejos y ratas (20).

3.2.2.1.6 Toxicidad:

Los extractos acuoso y etanólico de corteza, raíz y hojas son tóxicos a peces del género *Mollinesia* (19). Martínez indica que no es nociva al hombre ni a los animales, excepto la actividad vomitiva y purgante que puede presentar cuando se ingieren altas dosis (17).

3.2.3 Familia Malpighiaceae

3.2.3.1 *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth

3.2.3.1.1 Nombres vulgares: Nance, Chi, Craboo, Nanche, Nanzin, Tapal, Zacpah.

3.2.3.1.2 Descripción botánica y habitat:

Arbol de 3-10 m de alto, de copa redondeada o extendida, tronco recto, corteza café oscuro, rugosa y rosada por dentro. Hojas siempre verdes, opuestas, ovaladas o elípticas, coriáceas, de 5-20 cm de largo y 4-15 cm de ancho, puntiagudas. Flores de 5 pétalos, amarillas o anaranjadas de 1-2 cm de ancho, numerosas, en grupos erectos de 12 cm de largo y conspicuas. Fruta en drupa, 8-22 mm de diámetro, piel delicada, amarilla, carnoza blanca, jugosa, ácida, con olor peculiar y semilla negra muy dura. Crece en bosques secos de pino-encino y de clima tropical hasta 1,800 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, El Quiché, Escuintla, Suchitepéquez, Quetzaltenango y Zacapa (21).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

3.2.3.1.3 Usos etnomédicos:

El cocimiento de la corteza y flores se usa para tratar enfermedades respiratorias y dermatomucosas, dolor de muelas, hemorragias, mordedura de culebra, parásitos y tumores (22). A la corteza se le atribuye propiedad acaricida, antineurálgica, antitusiva, astringente, cicatrizante, digestiva, emenagoga, febrífuga, galactogoga y tónica (21). El fruto se come en helado, jalea, refresco y bebida fermentada. La corteza se usa en la industria artesanal de cueros y la madera en la construcción y en la fabricación artesanal de carbón (23).

3.2.3.1.4 Composición química:

La corteza tiene 20-30 por ciento de taninos, 2.7 % de ácido oxálico y glucósidos. En las hojas encontramos saponinas, esteroides insaturados, cardenólidos, bufadienólicos, flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles y triterpenoides (12).

3.2.3.1.5 Farmacología:

Estudios de la actividad antibacteriana *in vitro* demuestran que la maceración hidroalcohólica de la corteza es activa contra enterobacterias, *S. pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*, posee actividad contra *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Candida stellatoidea*. La decocción de la corteza es efectiva contra dermatofitos y posee actividad fungistática (22, 24).

3.2.3.1.6 Toxicidad:

La cáscara del fruto se utiliza para envenenar peces. A la corteza se le atribuye cierta toxicidad, aunque no hay estudios específicos (25).

3.2.4 Familia Myrtaceae

3.2.4.1 *Psidium guajava* L.

3.2.4.1.1 Nombres vulgares: Guayaba, Cak, Ch'amxuy, Coloc, Eanandí, Ikiec, Guava, Patá, Pataj, Pichi, Posh.

3.2.4.1.2 Descripción botánica y habitat:

Arbol de 10 m de alto, tronco 20-25 cm de diámetro, corteza suave, pubescente, delgada, rojo-café, produce escamas que caen. Hojas verdes, opuestas, peciolo corto, elípticas u oblongas, 5-15 cm de largo, redondas en el ápice y en la base, múltiples venas horizontales, conspicuas, provistas de glándulas. Flores axilares, solitarias, blancas, 3-4 cm de ancho, penacho de 275 estambres. Frutos aromáticos, ovals o piriformes, 2-10 cm de largo, cáscara amarilla, carnaza rosada o amarilla, por fuera granular y firme, al centro suave, lleno de pulpa jugosa con muchas semillas color café claro, 3-5 mm de largo redondas y duras (26). Nativo de América tropical, se encuentra en bosques húmedos y secos, pastos y bosquecillos puros del árbol; sembrado comercialmente en zonas cálidas de Africa y Asia hasta 1,800 msnm (12).

3.2.4.1.3 Usos etnomédicos:

La decocción de hojas y corteza se usa por vía oral para tratar afecciones digestivas (amebiasis, diarrea, disentería, cólico, dolor de estómago, parasitismo intestinal, vómito) (27, 28); anemia, artritis (29), diabetes (28), hemorragia, hinchazón, uretritis, asma y resfrío (27, 28). Por vía tópica se usa para tratar afecciones de la piel, asma y lengua inflamada (30).

3.2.4.1.4 Composición química:

La planta es rica en taninos (31), las hojas contienen grasa (6%),

β -sitosterol, ácido maslínico y elágico, aceite esencial (0.1-0.3 %), triterpenoides, ácidos orgánicos, flavonoides derivados de quercitina como guayaverina y avicularina (12, 32). El tamizaje fitoquímico del fruto indica la presencia de polifenoles, taninos, terpenos, glicósidos esteroidales, antraquinonas; la raíz contiene leucoantocianinas, esteroides y ácido gálico (12). La corteza contiene 10% de elagitaninos. El extracto etanólico de flores contiene ácido oleanólico, ácido elágico, quercetina y glicósidos flavonoides (guayaverina) (33).

3.2.4.1.5 Farmacología:

Por su actividad astringente, antidiarreica, antibacteriana, espasmolítica y ligeramente sedante está indicada en el tratamiento de diarrea, disentería, cólico e infecciones respiratorias (32). La actividad antidiarreica se atribuye a las quercetinas de las hojas y corteza, la actividad antibacteriana se atribuye a los flavonoides y la actividad antiprotozoárica se atribuye al ácido psidiólico (34).

3.2.4.1.6 Toxicología:

Los extractos etanólico y acuoso de hojas, raíces y tallos fueron muy tóxicos para peces del género *Mollinesia* (500 ppm) (30). Al fruto se le atribuye propiedad abortiva (12).

3.2.5 Familia Simaroubaceae

3.2.5.1 *Simarouba glauca* DC.

3.2.5.1.1 Nombres vulgares: Aceituno, Jocote de mico, Negrito, Olivo, Pasac.

3.2.5.1.2 Descripción botánica y habitat:

Arbol dioico, hasta 15 m de alto, tronco de 30 cm de diámetro, lampiño. Hojas largas, 10-20 foliolos, coriáceas oblongas, 5-10 cm de largo, ápice agudo, base desigual; panículas largas, cerradas, elásticas. Flores blanquecinas, cáliz 3-4 mm de ancho, lóbulos ovalados o triangulares, obtusos o agudos, ciliados, pétalos oblongos, 4-6 mm de largo. Fruto en drupa ovalada, 1-2 cm de largo; pulpa gruesa, color rojo, se torna negra al madurar (21). Nativo de Mesoamérica en bosques secos subtropicales, regiones húmedas o pobladas en matorrales, sobre laderas secas rocosas abiertas, en variedad de regiones desde el sur de México a Centro América y el Caribe en alturas hasta 900 msnm (21).

3.2.5.1.3 Usos etnomédicos:

La infusión de la corteza y raíz se usa por vía oral para tratar malaria (35), afecciones gastrointestinales (36), nerviosismo, fiebre intermitente (37) y tos (32). La tintura de hojas tiene actividad antiamebiana (12).

3.2.5.1.4 Composición química:

Las hojas y la corteza contienen flavonoides, polifenoles, sesquiterpenlactonas, taninos (36), alcaloides y cuasinoides (18). Las semillas contienen lípidos, alcoholes triterpénicos, ésteres de esteroides y del glaucarrubol y glaucarrubina, hasta 62% de aceite y un glicósido cristalino tóxico (fórmula C₂₂H₃₆O₉) (12).

3.2.5.1.5 Farmacología:

Estudios antibacterianos demuestran que la tintura de hojas es activa contra *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri* e inactiva contra *E. coli* enteropatógena, *S. aureus*, *S. enteritidis* y *Shigella dysenteriae* (19, 22).

Estudios farmacológicos demuestran que la infusión de hojas por vía oral produce broncoconstricción en conejos; el extracto acuoso por vía subcutánea en ratas ligadas del píloro redujo el índice de ulceración, el número de úlceras, el volumen de líquido gástrico y el ácido libre, por vía oral, careció de efecto antiulcerogénico y no modificó el índice de ulceración (32).

3.2.5.1.6 Toxicología:

Los extractos acuoso y etanólico son tóxicos a peces (19).

3.3 Evaluación de toxicidad

3.3.1 Tipos de mecanismos para toxicidad

Existen tres tipos de mecanismos para toxicidad siendo estos, citotoxicidad basal que incluye procesos que involucra estructuras y funciones comunes a todas las células del cuerpo, como membrana celular, mitocondria, ribosomas, cromosomas y lisosomas. La citotoxicidad basal de un químico por lo tanto, puede demostrarse como resultado del ataque a la integridad de la membrana celular, actividad mitocondrial o a la síntesis protéica o de ADN (38).

La citotoxicidad órgano específica, que es el efecto de un químico en las funciones especializadas características de un tipo celular en particular (38), y la toxicidad a nivel de organismo, que se da cuando los químicos interfieren con productos del metabolismo o secreciones considerados como interferentes de funciones órgano específicas, pueden llegar a afectar la función de todo el organismo.

14

El resultado neto de cada uno de los mecanismos anteriormente descritos es la pérdida de la integridad de la membrana celular (38).

3.3.2 Evaluación de la toxicidad *in vitro*

Para la evaluación de la citotoxicidad se han desarrollado diversos métodos como el bioensayo con *A. salina* que permite determinar citotoxicidad de forma rápida, confiable, de fácil montaje y no costosa. Los nauplios de *A. salina* son altamente sensibles a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de vegetales. El procedimiento determina valores de Concentración Letal 50 (CL50) en $\mu\text{g/ml}$ de los químicos y extractos vegetales evaluados. La CL50 es la dosis de sustancia evaluada que mata al 50% de las larvas del crustáceo (4, 39).

También es utilizado para la evaluación de citotoxicidad el ensayo del MTT que revela daños celulares a nivel mitocondrial. Se realiza con la línea celular transformada de mamífero V-79 (fibroblastos de pulmón de hamster chino). Consiste en agregar a una suspensión celular de concentración adecuada distintas concentraciones de extractos vegetales las que son incubadas y luego tratadas con bromuro de 3-(4,5 dimetil tiazol-2-il-2,5-difenil) tetrazolio (MTT) que es un producto que revela el daño mitocondrial al penetrar solamente en las mitocondrias de las células viables produciendo un color azul que es medido espectrofotométricamente a 540 nm, la absorbancia obtenida es proporcional a la cantidad de células viables que quedaron luego de la exposición al extracto (40).

El ensayo de clonación es un ensayo de citotoxicidad que revela el daño celular producido a nivel de ADN. Mide la integridad reproductiva de la

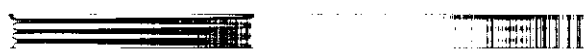
célula, es decir la capacidad que una célula tiene de dividirse como mínimo seis veces después de ser sometida a un tratamiento. Se realiza con cultivos de la línea celular V-79 incubados con extractos de plantas por un corto período de tiempo, luego del cual se siembran las células ya tratadas y se incuban por una semana para permitir el crecimiento de clones, cuyo número determina la eficiencia clonogénica (No. de clones por pozo/No. de células sembradas) que es una medida directa de la integridad reproductiva de las células (41).

3.3.3 Evaluación de toxicidad *in vivo*

Luego de evaluar la citotoxicidad que puede ser producida por una sustancia, se evalúa su posible toxicidad *in vivo* utilizando diferentes métodos como la toxicidad aguda en ratón. La toxicidad aguda cuantifica los efectos adversos que ocurren dentro de un breve lapso posterior a la administración de una dosis única o múltiple. El método consiste en el tratamiento de un grupo de animales, con diferentes dosis de una misma sustancia, con el fin de determinar la dosis que mataría a la mitad del grupo y la función dosis respuesta (42-45).

El ensayo de micronúcleos se utiliza para medir la toxicidad que se manifiesta por un daño genético. Dicho ensayo estudia el posible daño genético *in vivo* basándose en contabilizar los trozos de cromatina que han sido generados por la acción de un agente químico sobre los cromosomas celulares. Para visualizar este daño se usa como modelo celular eritrocitos jóvenes de ratón que recientemente han expulsado el núcleo (46, 47).

En la evaluación de la toxicidad característica de una sustancia química, la determinación de toxicidad subcrónica por vía oral puede llevarse a



cabo por información inicial sobre toxicidad, obtenida de estudios de toxicidad aguda, o probablemente por administraciones repetidas por un limitado período de tiempo. La información sobre los órganos blanco de la sustancia química y la estimación de un nivel en el cual no se presente ningún efecto a la exposición, resultan útiles en la selección de los niveles de dosis para estudios de toxicidad crónica y para establecer criterios de seguridad para exposición humana (48).

La sustancia a ser estudiada es administrada oral y diariamente. Se hacen varios grupos de animales. Se administra una dosis por grupo, por un período de 90 días. Durante el período de administración los animales son observados diariamente detectando signos de toxicidad. A los animales que mueran en el período de administración se les practica la necropsia y al final del ensayo, todos los animales supervivientes se sacrifican, se les hace la necropsia y se les efectúa un examen histopatológico (48).

3.3.4 Teratogenicidad

Se ha demostrado la existencia de químicos que son potencialmente tóxicos al feto, causantes de malformaciones estructurales, disfunciones fisiológicas, alteraciones de la conducta y deficiencias en la progenie, al nacer o inmediatamente después del período post-natal (38).

Los métodos clásicos para evaluar teratogenicidad incluyen generalmente, roedores y conejos, principalmente por su corto período gestacional en comparación a otras especies (21 y 32 días respectivamente), además de la cantidad de crías por gestación, ya que se puede obtener de 8 a 10 embriones por embarazo. Esto permite determinar el número de fetos afectados y es un indicador particular de la selectividad y medida de toxicidad.

El procedimiento usualmente incluye la exposición a la sustancia a evaluar antes o inmediatamente después de la concepción. La secuencia periódica de la exposición depende de los puntos de interés del investigador. Si se desea determinar los efectos en el desarrollo del feto la exposición debe ser después de la concepción. Si se desea determinar los efectos en la concepción la exposición debe comenzar justo antes del apareamiento. Pero para esto último debe determinarse cuidadosamente las secuencias de exposición para no interferir con el apareamiento (49).

3.3.5 Mutagenicidad

Es la capacidad de una sustancia para producir cambios en genes o cromosomas, muchos estudios relacionan mutagenicidad y carcinogenicidad (50). Estudios sobre carcinogénesis han demostrado que la inducción de muchos cánceres puede deberse a la exposición a sustancias que causan eventos mutacionales (38). Muchos agentes antitumorales conocidos tienen como mecanismo de acción la interacción con el ADN alterando su función o expresión. Existen diversos ensayos que fueron creados para detectar respuestas mutagénicas en agentes químicos o naturales que utilizan este mecanismo de acción (51).

3.3.5.1 Ensayos basados en interacción con ADN:

3.3.5.1.1 Ensayos que utilizan sistemas microbianos:

Entre estos están los ensayos que utilizan sistemas bacterianos como la prueba con *Bacillus subtilis*, donde se hace actuar directamente al agente químico sobre el ADN transformante, la alteración de la actividad biológica del ADN que es provocada por la sustancia química es estudiada mediante recombinación genética con cepas mutadas de *B. subtilis*. Entre las cepas que se han utilizado están *B. subtilis* BSA 170 auxótrofo para triptófano y



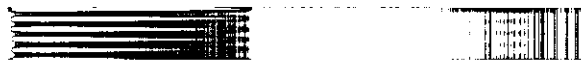
uracilo y la cepa H17 que posee una recombinación de ADN regular y propiedades reparadoras (50, 52).

En el Inductest se utiliza mutantes de *E. coli* para evaluar potencial mutagénico. Las cepas mutadas de *E. coli* son cultivadas en un medio enriquecido, luego son sembradas sobre cajas de agar LB y mezcla S9 (homogenizado de hígado de rata utilizado para la activación metabólica). Se perforan agujeros equidistantes en las cajas recién inoculadas con *E. coli* en los que se vierte el extracto a evaluar. Las sustancias mutágenas dan la formación de una placa de lisis turbia. La presencia de una placa completamente clara generalmente no indica toxicidad (53, 54).

La prueba de Ames es otro ensayo microbiano que utiliza cepas mutadas de *Salmonella typhimurium* que poseen diferentes regiones genéticas mutadas que proporcionan características específicas en cada cepa que pueden ser revertidas por las sustancias con potencial mutagénico (38). La prueba consiste en la incorporación de la cepa bacteriana, la mezcla de S9 (un homogenizado crudo de hígado de rata) y el mutágeno a una placa de agar mínimo que es incubado a 37 °C por 48 horas, luego de las cuales se cuentan las colonias que fueron revertidas. Es importante el uso de un control positivo y uno negativo para la validación de éste ensayo (5, 55, 56).

3.3.5.1.2 Ensayo de excisión del ADN

Los ensayos de ruptura de ADN emplean ADN circular superenrollado como sustrato para la excisión de la hebra de ADN que puede ser mediada por agentes potencialmente antitumorales originados de fuentes naturales. Típicamente el extracto natural crudo es incubado con el ADN (en presencia o ausencia de cofactores como Cu^{2+}) a temperatura ambiente por 30 minutos, luego la mezcla es pasada por electroforesis (51).



3.3.5.1.3 Evaluación de la inhibición de la acción biológica de Topoisomerasa I y Topoisomerasa II

Aun en el nivel más rudimentario, la complejidad en la replicación de dos bandas helicoidales entrelazadas de ADN por medio de mecanismos semiconservativos es obvia. Se necesita una cantidad sustancial de procesos para facilitar la replicación semiconservativa manteniendo la integridad molecular y estructural. Las topoisomerasas I y II son algunas de las enzimas requeridas para esta importante función biológica. Estas enzimas son capaces de romper ADN transversalmente ya sea en una cadena de ADN (topoisomerasa I) o en un par de cadenas complementarias (topoisomerasa II) y de reunir la estructura original del ADN.

Considerando la naturaleza de las reacciones catalizadas por las topoisomerasas, es posible que la inhibición de su actividad, medida por drogas, pueda inducir una respuesta biológica. Han sido establecidas como inhibidores de topoisomerasa II las cumarinas, quinolones, antracilinas, elipticinas y epipodofiloxinas; como inhibidor de la topoisomerasa I sólo se encontró a camptotecin (51).

3.3.5.1.4 Determinación de la interacción directa con el ADN

Utilizando procedimientos de cromatografía de alta presión (HPLC), se han establecido recientemente sistemas que pueden servir para el tamizaje y monitoreo de sustancias capaces de interactuar con el ADN, utilizando una columna analítica de HPLC con C₁₈. El ADN se eluye con el frente de solvente (pico no retenido); si se inyecta conjuntamente ADN con sustancias que se conoce se unen al mismo, disminuye el tamaño del pico; la preinyección de sustancias que unen ADN y que son retenidas por la columna ocasionan el mismo resultado. Por lo que estos procedimientos pueden tener un



valor general para facilitar la identificación de extractos de plantas que contengan sustancias capaces de unirse al ADN y la posterior identificación del principio activo. Una aplicación podría incluir el fraccionamiento de un extracto vegetal y la determinación de la actividad de cada fracción usando ADN y procedimientos de elución con HPLC (51).

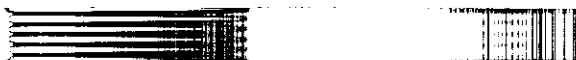
3.3.5.1.5 Microensayo colorimétrico:

Es un ensayo utilizado para la detección de agentes que interactúan con el ADN teniendo actividad de ADNasa, actividad con la cual se podría esperar que en determinadas condiciones llegaran a hacer intercalaciones de segmentos de ADN que interferirían con todo el aparato genético celular (6).

Este ensayo utiliza como sustrato un complejo formado por ADN y el colorante 4-[p-(dimetil amino)- α -[p-(dimetilaminofenil)] benziliden] 2, 5-ciclohexadieno-1-iliden] dimetilamonio cloro etobromuro, también conocido como verde de metilo (VM) (6).

El VM es un colorante histoquímico que formando un complejo con ADN es utilizado como un sustrato experimental para la determinación de desoxirribonucleasas. El complejo ADN/VM es disociado por drogas cuyos bioreceptores son moléculas de ADN (57). El desplazamiento del VM del complejo ha sido utilizado para estudios de afinidades de drogas sintéticas, antibióticos y alcaloides a la doble hélice del ADN.

El ensayo mide la actividad de ADNasa presente en compuestos químicos y extractos naturales, esta se pone en evidencia por una disminución de la absorbancia, la cual es causada por la liberación del VM del complejo ADN/VM, lo que provoca la formación de carbinol, un compuesto incoloro (6,57).



El uso del complejo ADN/VM como sustrato de ADNasa o en ensayos de desplazamientos se basa en el hecho de que éste complejo es estable a pH 7.5 a diferencia de la inestabilidad del VM libre a éste pH, el cual experimenta cambios moleculares por la unión de una molécula de agua dando en la formación de un carbinol incoloro, reacción que puede ser seguida espectrofotométricamente en base de la extinción de la absorbancia a una longitud de onda de 630nm (6, 57).

La información relacionada con la estructura del complejo ADN/VM es escasa, por lo que es difícil inferir el mecanismo por el cual el colorante es desplazado de la doble hélice del ADN. El VM se une al ADN con una estequiometría de una molécula por trece nucleótidos e inhibe la fotodimerización de pirimidinas sobre un intervalo crítico de veinte pares de bases. Estudios sobre el complejo han concluido en que el colorante no está intercalado en la doble hélice y que se une a esta en su conformación B con fuerzas de unión que son predominantemente electrostáticas (57).

En su forma compleja con el ADN, el colorante VM es estable y protegido de la oxidación producida por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La unión del VM es preferible con una doble hélice de ADN nativo, el ADN desnaturalizado por calor une poco VM (57).

Al exponer ADN a una concentración de etanol al 20% v/v, se observa una disminución brusca en la viscosidad el cual disminuye aun más con el incremento en las concentraciones de alcohol. Hasta una concentración de 40% disminuye la temperatura media térmica de desnaturalización (T_m) del ADN. En concentraciones mayores al 40% de etanol se observa un incremento de la T_m debido a la transición gradual de la forma B del ADN a su forma A (57).

4. JUSTIFICACIONES

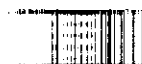
Se han realizado investigaciones para determinar la actividad antimicrobiana y farmacológica de extractos vegetales que han sido recomendados como un medicamento validado de la medicina popular. Sin embargo existe poca información sobre dichos preparados y su actividad tóxica potencial y otras formas de toxicidad que afectan el núcleo celular

Por su bajo costo, conocimiento empírico existente al respecto y relativa facilidad de obtenerlas, las plantas medicinales son utilizadas para el tratamiento de los síntomas de diversos procesos patológicos. La población tiende a asumir, dado el origen natural, que el uso de plantas medicinales puede ser prolongado sin que cause efectos secundarios, por lo que son utilizadas indiscriminadamente.

La posible toxicidad de las plantas medicinales no puede conocerse hasta que no se realicen estudios sobre su toxicidad aguda y su teratogenicidad.

En este trabajo se evaluó la citotoxicidad basal potencial de cinco extractos de plantas utilizadas en la medicina popular guatemalteca, mediante la utilización de un microensayo colorimétrico. El microensayo colorimétrico es una prueba relativamente fácil y rápida que nos da la opción de conocer en poco tiempo la actividad de ADNasa de compuestos químicos y naturales; y es una de las mejores opciones para evaluar citotoxicidad basal debido a su bajo costo y a la facilidad de su implementación en el laboratorio.

Basados en estudios previos de la actividad antimicrobiana, se seleccionaron cinco plantas de uso popular que pueden ser usadas por tiempo prolongado para el tratamiento de la sintomatología de afecciones comunes.



5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar la toxicidad crónica de algunos extractos de vegetales usados en la medicina popular guatemalteca.

5.2 Específicos

5.2.1 Estandarizar la técnica para la realización del microensayo colorimétrico para la determinación de la capacidad de interacción del ADN con cinco extractos de vegetales seleccionados.

5.2.2 Demostrar el potencial de actividad de ADNasa presente en los extractos de vegetales seleccionados.

6. HIPOTESIS

Ninguno de los cinco extractos vegetales investigados, presenta la misma actividad de ADNasa que berenil.

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
BIBLIOTECA



7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo

7.1.1 Universo de estudio

Plantas utilizadas en la medicina popular guatemalteca.

7.1.2 Muestra

Cinco extractos de vegetales usados en la medicina popular guatemalteca que han demostrado bioactividad. La selección se realizó en base a la frecuencia de uso y a las propiedades curativas demostradas de dichos extractos, utilizando el banco de datos de Laboratorio y Droguería de Productos Farmacéuticos Farmaya. Los extractos vegetales son *Annona reticulata* (anona), *Byrsonima crassifolia* (nance), *Psidium guajava* (guayaba), *Simarouba glauca* (aceituno) y *Tecoma stans* (timboco) (Anexo No. 1).

7.2 Recursos

7.2.1 Humanos

7.2.1.1 Investigador

Br. Carmen H. Guzmán Téllez

7.2.1.2 Asesor

Lic. Armando Cáceres



- 7.2.2 Físicos
 - 7.2.2.1 Equipo
 - Autoclave
 - Lector de ELISA
 - Potenciómetro
 - Agitador magnético
 - 7.2.2.2 Materiales
 - Erlenmeyer
 - Vasos de precipitar
 - Viales
 - Pipetas microbiológicas
 - Pipetas automáticas
 - Puntas plásticas
 - Placas de 96 pozos
 - 7.2.2.3 Reactivos
 - Complejo ADN/VM obtenido de Sigma (St. Louis, MO)
 - Berenil obtenido de Sigma (St. Louis, MO)
 - Solución amortiguadora Tris-HCl 0.05 M con pH 7.5
 - Sulfato de magnesio
- 7.2.3 Institucionales
 - 7.2.3.1 Laboratorio del Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica; Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC.



7.3 Métodos

Se preparó la solución amortiguadora Tris-HCl 0.05 M con pH 7.5 conteniendo 7.5 mM de MgSO₄, luego se tomaron 100 ml de esta solución y en ella se disolvieron 20 mg del complejo ADN/VM (Sigma, St. Louis, MO), se mezcló durante 24 horas a 37°C utilizando un agitador magnético (6, 57).

Se pesó la cantidad necesaria de extracto para obtener las concentraciones de 10, 100 y 1,000 µg/ml y se disolvieron con 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) y se llegó al volumen deseado agregando solución amortiguadora. Se colocaron 100 µl de cada concentración de extracto con 100 µl del complejo en los pozos de la microplaca. La absorbancia máxima del complejo ADN/VM más el extracto fue leída inmediatamente a 630 nm, luego la placa fue incubada a temperatura ambiente, en cámara oscura durante 24 horas, al término de las cuales fue medida la absorbancia final (6).

Se utilizó como blanco 100 µl de complejo ADN/VM más 100 µl de solución amortiguadora. También se hizo una lectura de la absorbancia de cada tratamiento reemplazando los 100 µl de complejo ADN/VM por 100 µl de solución amortiguadora, esto con el propósito de restar la interferencia que pudiera presentar el color del extracto en la lectura de la absorbancia; como control positivo se utilizó 100 µl de complejo ADN/VM más 100 µl de berenil. El berenil fue utilizado en una concentración de 60 µg/ml, esta concentración fue elegida de acuerdo a revisión bibliográfica sobre la actividad de ADNasa que presenta el berenil (6).

7.4 Diseño estadístico

7.4.1 Cálculo del número de repeticiones:

El número de repeticiones para cada tratamiento se obtuvo a partir de los siguientes cálculos:

$$n_j = \frac{2NC^2\sigma^2}{\Delta}$$

Donde:

$$NC = Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta}$$

$\alpha = 0.05$ (incrementa al aumentar el número de grupos a comparar)

$$\beta = 0.30 \text{ (con controles)}$$

$$NC = 2.58 + 1.28$$

$$NC = 3.86$$

$$\Delta = 2\sigma$$

Por tanto:

$$n_j = NC^2/2$$

$$n_j = (3.86)^2/2 = 7.44 = 7.0$$

El número de repeticiones por cada tratamiento o grupo fue de siete repeticiones por grupo a comparar.

7.4.2 Grupos a comparar:

Cada extracto se evaluó a 3 distintas concentraciones (10, 100 y 1,000 $\mu\text{g/ml}$), cada una de las cuales constituyó un tratamiento

distinto. En este estudio se incluyeron cinco extractos lo que hace un total de 15 tratamientos. Como control positivo se realizó un ensayo similar sustituyendo el extracto por berenil (100 μ l de berenil en concentración de 60 μ g/ml).

7.4.3 Análisis de resultados:

Para determinar si existía diferencia estadísticamente significativa entre los grupos o tratamientos, se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANDEVA), utilizando la siguiente hipótesis estadística:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$$

Donde:

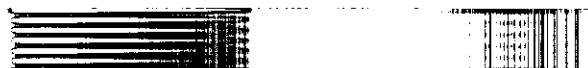
μ_1 = control positivo (berenil, 60 μ g/ml)

μ_2 = extracto en concentración de 10 μ g/ml

μ_3 = extracto en concentración de 100 μ g/ml

μ_4 = extracto en concentración de 1,000 μ g/ml

Se efectuó un ANDEVA con hipótesis estadística para cada uno de los extractos naturales. Para cada uno de los análisis la conclusión estadística fue rechazar H_0 , indicando que alguno de los grupos o tratamientos presentan respuesta diferente, por lo que se procedió a efectuar comparaciones tomando como referencia al control positivo. La prueba específica utilizada para este tipo de comparaciones fue la prueba de Dunnett, con las siguientes hipótesis estadísticas para cada extracto o tratamiento:



$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_0: \mu_1 = \mu_3$$

$$H_1: \mu_1 = \mu_4$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_3$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_4$$

Donde:

μ_1 = control positivo (berenil, 60 $\mu\text{g/ml}$)

μ_2 = extracto en concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$

μ_3 = extracto en concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$

μ_4 = extracto en concentración de 1,000 $\mu\text{g/ml}$

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

8. RESULTADOS

Se efectuó un análisis para observar el comportamiento del control positivo (berenil), utilizando dosis de 30, 60, 120, 240 y 480 $\mu\text{g/ml}$, obteniéndose los siguientes resultados:

Resultados del microensayo colorimétrico de interacción con el ADN de Berenil

Concentración de Berenil	Diferencia de Absorbancias ($A_f - A_0$)
30 $\mu\text{g/ml}$	0.113
60 $\mu\text{g/ml}$	0.138
120 $\mu\text{g/ml}$	0.165
240 $\mu\text{g/ml}$	0.177
480 $\mu\text{g/ml}$	0.200

Anexo No. 2

Se calculó el r siendo este igual a 0.90. El error estándar para siete repeticiones de la concentración de berenil utilizada como control positivo (60 $\mu\text{g/ml}$) fue del 8%.

Se realizó el ensayo con cada uno de los extractos vegetales en concentraciones de 10, 100 y 1,000 $\mu\text{g/ml}$.

Se obtuvieron lecturas de la absorbancia inicial A_0 (tiempo cero de

incubación) que presentaba cada uno de los tratamientos y también de las absorbancias después de 24 horas de incubación A_f . Las dos lecturas fueron obtenidas utilizando una longitud de onda de 630 nm. La actividad de los extractos naturales evaluados se analizó en base a las diferencias de absorbancia que presentaba cada uno de los tratamientos. Estas diferencias fueron analizadas estadísticamente utilizando como referencia al control positivo que fue berenil.

Se tomó como absorbancia inicial (A_0) para todos los tratamientos la lectura del blanco, y como absorbancia final a la A_f del complejo ADN/VM que se presenta en cada uno de los tratamientos. Los resultados obtenidos para cada tratamiento se presentan a continuación:

Resultados del microensayo colorimétrico de interacción con el ADN del extracto etanólico de *Annona reticulata*

Tratamiento	Diferencia de Absorbancias ($X \pm Ds$; $n=7$)	Error Estándar (%)
Berenil 60 $\mu\text{g/ml}$	0.181 \pm 0.020	8
<i>A. reticulata</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	0.166 \pm 0.026	10
<i>A. reticulata</i> 100 $\mu\text{g/ml}$	0.165 \pm 0.024	9
<i>A. reticulata</i> 1,000 $\mu\text{g/ml}$	0.142 \pm 0.024	9

**Pruebas estadísticas de los resultados del microensayo colorimétrico
de interacción con el ADN del extracto etanólico de
*Annona reticulata***

Grupos a comparar	Diferencias	Fisher PLSD	Sheffe F-test	Dunnet t
Berenil 60 µg/ml vs. <i>A. reticulata</i> 10 µg/ml	0.015	0.016	1.348	2.011
Berenil 60 µg/ml vs. <i>A. reticulata</i> 100 µg/ml	0.016	0.016	1.561	2.164
Berenil 60 µg/ml vs. <i>A. reticulata</i> 1000 µg/ml	0.039	0.016*	9.315	5.286

* Diferencia significativa del 95% con el control positivo Berenil 60 µg/ml
(Anexo No. 3).

**Resultados del microensayo colorimétrico de interacción con el ADN
del extracto etanólico de *Byrsonima crassifolia***

Tratamiento	Diferencia de Absorbancias ($\bar{X} \pm D_s$; n=7)	Error Estándar (%)
Berenil 60 µg/ml	0.181±0.020	8
<i>B. crassifolia</i> 10 µg/ml	0.156±0.021	8
<i>B. crassifolia</i> 100 µg/ml	0.048±0.020	8
<i>B. crassifolia</i> 1,000 µg/ml	0.263±0.019	7

**Pruebas estadísticas de los resultados del microensayo colorimétrico
de interacción con el ADN del extracto etanólico de
*Byrsonima crassifolia***

Grupos a comparar	Diferencias	Fisher PLSD	Sheffe F-test	Dunnet t
Berenil 60 µg/ml vs. <i>B. crassifolia</i> 10 µg/ml	0.025	0.022*	1.8*	2.324
Berenil 60 µg/ml vs. <i>B. crassifolia</i> 100 µg/ml	0.133	0.022*	51.538*	12.434
Berenil 60 µg/ml vs. <i>B. crassifolia</i> 1000 µg/ml	0.082	0.022*	19.522*	7.653

* Diferencia significativa del 95% con el control positivo Berenil 60 µg/ml
(Anexo No. 3)

**Resultados del microensayo colorimétrico de interacción con el ADN
del extracto etanólico de *Psidium guajava***

Tratamiento	Diferencia de Absorbancias ($X \pm D_s$; n=7)	Error Estándar (%)
Berenil 60 µg/ml	0.181±0.020	8
<i>P. guajava</i> 10 µg/ml	0.161±0.017	7
<i>P. guajava</i> 100 µg/ml	0.155±0.028	10
<i>P. guajava</i> 1,000 µg/ml	0.108±0.026	10

**Pruebas estadísticas de los resultados del microensayo colorimétrico
de interacción con el ADN del extracto etanólico de
*Simarouba glauca***

Grupos a comparar	Diferencias	Fisher PLSD	Sheffe F-test	Dunnct t
Berenil 60 µg/ml vs. <i>S. glauca</i> 10 µg/ml	0.049	0.015*	16.958*	7.133
Berenil 60 µg/ml vs. <i>S. glauca</i> 100 µg/ml	0.059	0.015*	23.937*	8.474
Berenil 60 µg/ml vs. <i>S. glauca</i> 1000 µg/ml	0.048	0.015*	16.086*	6.947

* Diferencia significativa del 95% con el control positivo Berenil 60 µg/ml
(Anexo No. 3)

**Resultados del microensayo colorimétrico de interacción con el ADN
del extracto etanólico de *Tecoma stans***

Tratamiento	Diferencia de Absorbancias ($X \pm D_s$; n=7)	Error Estándar (%)
Berenil 60 µg/ml	0.181±0.020	8
<i>T. stans</i> 10 µg/ml	0.155±0.018	7
<i>T. stans</i> 100 µg/ml	0.163±0.014	5
<i>T. stans</i> 1,000 µg/ml	0.147±0.014	5

Pruebas estadísticas de los resultados del microensayo colorimétrico de interacción con el ADN del extracto etanólico de *Tecoma stans*

Grupos a comparar	Diferencias	Fisher PLSD	Sheffe F-test	Dunnet t
Berenil 60 µg/ml vs. <i>T. stans</i> 10 µg/ml	0.026	0.011*	8.083*	4.924
Berenil 60 µg/ml vs. <i>T. stans</i> 100 µg/ml	0.018	0.011*	3.832*	3.390
Berenil 60 µg/ml vs. <i>T. stans</i> 1000 µg/ml	0.034	0.011*	13.556*	6.377

* Diferencia significativa del 95% con el control positivo Berenil 60 µg/ml
(Anexo No. 3)

9. DISCUSION DE RESULTADOS

El microensayo colorimétrico para la evaluación del potencial de interacción con el ADN es un método reproducible (error estándar $\leq 10\%$). La ecuación obtenida con los resultados de la curva patrón de interacción con el ADN de berenil se ajustan mejor a una ecuación hiperbólica que a una lineal (Anexo No. 2), pero para conocer mejor su comportamiento es necesario la realización de más pruebas. El análisis efectuado al control positivo berenil demostró que su comportamiento era el esperado; a pesar que a $30 \mu\text{g/ml}$ ya se observa la actividad de ADNasa se utilizó una concentración de $60 \mu\text{g/ml}$ porque es la concentración aconsejada en la literatura para el uso de berenil como control.

Las desviaciones estándar calculadas a partir de las 7 repeticiones que se hicieron por tratamiento, son aceptables. El error calculado no excede al 10% en ninguno de los casos por lo que también es considerado aceptable.

En todos los extractos analizados se observó que los tratamientos en dosis de $1,000 \mu\text{g/ml}$, presentaban una respuesta dosis-efecto que no correlaciona con la presentada por los tratamientos en concentraciones de 10 y $100 \mu\text{g/ml}$, ya que se obtuvo una menor diferencia entre la absorbancia inicial y la final con la concentración mayor que con las dos últimas mencionadas. Algunas de las razones que podrían explicar éste fenómeno son la interferencia que presenta el color natural del extracto con la reacción de desplazamiento del colorante VM del complejo ADN/VM, o que en altas concentraciones los extractos contengan metabolitos que inhiban la formación de carbinol luego del desplazamiento del colorante verde metilo y que la acción del mismo no afectara en las concentraciones de 10 y $100 \mu\text{g/ml}$ por ser muestras más diluidas. Por lo cual para el análisis estadístico sólo fueron utilizadas las concentraciones de 10 y 100

$\mu\text{g/ml}$.

Aunque los extractos fueron filtrados en una columna empacada con 10 cm de tierra de diatomeas para eliminar el color natural de los mismos, siempre existía cierta coloración lo que definitivamente influyó en las absorbancias obtenidas, razón por la cual los cálculos de las diferencias fueron basadas únicamente en el cambio existente en el complejo ADN/VM.

Por lo expuesto, se considera que para realizar análisis del potencial como ADNasa de extractos naturales, utilizando el microensayo colorimétrico, deben utilizarse fracciones purificadas de dichos extractos y no trabajarse con los extractos crudos como se hizo en esta oportunidad. Aunque es importante hacer notar que la población consume los extractos crudos y no fracciones de los mismos.

En el análisis de *Anona reticulata* se observa que las concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ presentan un comportamiento similar, y que la diferencia no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$), con respecto al control positivo de berenil. Para el extracto de *Byrsonima crassifolia* la diferencia de absorbancias fue mayor para la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ que para la de 100 $\mu\text{g/ml}$; se observó que después del período normal de 24 hr de incubación el extracto de 100 $\mu\text{g/ml}$ presentó un precipitado en el fondo de la microplaca, este factor interfirió en las lecturas lo que explica los resultados obtenidos.

Con *Psidium guajava*, *Simarouba glauca* y *Tecoma stans* los resultados demuestran que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el comportamiento presentado por los tres extractos y el control positivo de berenil, con lo cual se concluye que ninguno de estos extractos en las concentraciones evaluadas poseen la misma actividad que el berenil en concentración de 60 $\mu\text{g/ml}$.



10. CONCLUSIONES

- 10.1. El microensayo colorimétrico para la evaluación del potencial de interacción de ADN con extractos naturales es un método reproducible, y que puede ser utilizado en el laboratorio por la facilidad de su aplicación.
- 10.2. El extracto etanólico de *Annona reticulata* presenta actividad potencial de ADNasa en concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$.
- 10.3 El método utilizado permite la evaluación de la actividad potencial de interacción ADN-extracto, lo cual nos da indicios de la toxicidad crónica de extractos vegetales.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Orellana SI. Indian Medicine in Highland Guatemala. Albuquerque. Universidad New Mexico Press 1987;308
2. Isono K, Yourno J. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1974;71(5):1612-1617
3. Bresolin S, Ferraro V. Phytother Res 1993;7:260-262
4. Meyer BN, *et al.* Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. J. Med Plant Res 1982;45:31-37
5. Maron D, Ames B. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mut Res, Elsevier Biomed Press 1983;113:173-215
6. Burres N, *et al.* A colorimetric microassay for the detection of agents that interact with DNA. J. Med Plant Res 1992;55:1582-1587
7. Meza K. Actividad antimicótica de siete plantas nativas de uso medicinal del departamento de Alta Verapaz. Guatemala: USAC, (tesis de graduación, Facultad de CCQQ y Farmacia) 1995;53p
8. Hacia una farmacopea caribeña. Honduras: Tramil 1989. 45-49p.
9. Cáceres A, Samayoa B. Tamizaje de la actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Guatemala: DIGI-USAC 1989. 121-122p

10. Cáceres A. *et al* Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 2. Evaluación of activity of 16 plants against Gram-positive bacteria. *J. Ethnopharmacol* 1993;39: 77-82
11. Linares E, *et al*. *Tes curativos de México*. México, UNAM 1990;109-110p.
12. Morton JF. *Atlas of Medicinal Plants of Middle America*. Springfield: Charles C Thomas, 1981. 829p.
13. Morton JF. Some folk-medicine plants of Central American markets. *Quart J Crude Drug Res* 1977;15:165-192
14. Pérez RM. A study of the hipoglucemic effect of some Mexican plants. *J. Ethopharmacol* 1984;12:253-262
15. Mejia JV. *Geografía de la República de Guatemala*. Guatemala: Tipografía Nacional, 1927. 400p.
16. Cabrera LG. *Plantas curativas de México*. México: Ed. Cicerón, 1958. (p.247-248)
17. Martínez M. *Plantas útiles de la flora mexicana*. México: Ed. Botas, 1959. (p.330-333)
18. Glasby JS. *Dictionary of plants containing secondary metabolites*. London: Ed. Taylor & Francis, 1991. (p.316)

19. Planter. Obtención y aprovechamiento de extractos vegetales de la flora salvadoreña. San Salvador: Universidad de El Salvador 1989;93p.
20. Atal CK., Cultivation and utilization of aromatic plants. Jammu-Tawi, Reg. Res. Lab 1982;598
21. Ronquillo FA, *et al.* Especies Vegetales de uso actual y potencial en alimentación y medicina de las zonas sub-áridas de nororiente de Guatemala. Guatemala: USAC-DIGI 1989. 37-40p
22. Cáceres A, *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders.1.Screening of 84 plants against enterobacteria. J. Ethnopharmacol 1990;30:53-73
23. Mellen GA. El uso de las plantas medicinales en Guatemala. Guatemala Ind 1974;9:99-179
24. Cáceres A, *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections.1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. J. Ethnopharmacol 1991;31:263-276
25. Escobar N. Flora Tóxica de Panamá. Panamá: Ed. Universitaria, 1972. 170p.
26. Standley PC, Williams LO. Flora of Guatemala. Fieldiana:Botany 1964;24(7):281
27. Linares E., *et al.* Selección de plantas medicinales de México. México: Ed. Limusa, 1988. 54p

28. Girón LM, *et al.* Ethnobotanical Survey of the Medicinal Flora Used by the Caribs of Guatemala. *J. Ethnopharmacol* 1991;34:173-187
29. House PR, Lagos-Witte S. Manual de 50 plantas medicinales de Honduras. Tegucigalpa: CONS-H/CIIR/UNAH 1989. 70p.
30. Ayensu ES. Medicinal plants of the west Indies. Algonac, Reference Pub 1981;136
31. Honychurch P. Caribbean wild plants and their uses. Hong Kong, Macmillan Caribbean 1986;64
32. Robineau L. Hacia una Farmacopea Caribeña. Santo Domingo: ENDA-Caribe, UNAH 1991. 315p.
33. Ramachandran AG, *et al.* Polyphenolic compounds from flowers of *Psidium guajava*. *Fitoterapia* 1987;58:204-205
34. Martínez R. *Psidium guajava* para el tratamiento de la tricomoniasis vaginal. Guatemala: USAC, (tesis de graduación, Facultad de CCQQ y Farmacia) 1993;41p.
35. Nelson CH. Plantas comunes de Honduras. Tegucigalpa: Ed. Universitaria, 1986. 52p.
36. Ronquillo FA. *et al.* Especies vegetales de uso actual y potencial en alimentación y medicina de las zonas semiáridas del noroiente de Guatemala. Guatemala: Cuadernos DIGI 5-88 1988. 106p.

46. Sladek NE. Ensayo de Micronúcleos. *Cancer Research*. 1972;32:535-542
47. Schmid W. *Chemical mutagens, principles and methods for their detection*. A. Hollaender Plenum Press 1976;31-53
48. OEDC. *Guideline for testing of chemicals repeat dose oral toxicity-rodent, 90 days study*. 1987
49. Scharolein JL, Schwetz BA, Denel MF. Species sensitivities and prediction of tetratogenic potential. *Environmental Health Perspectives* 1985;61:55-67
50. Ungsurungsie M. *Mutagenicity Screening of Popular Thai Spices*. 1982;527-530
51. Suffness M, Pezzuto J. Assay related to cancer drug discovery. *Methods in plant biochemistry* 1991;6:71-133
52. D'Aquino, Santini P, Moretton JM. Estudio comparativo de métodos microbianos para la detección de tóxicogenéticos. *Revista Argentina de Microbiología*. 1979;2:57-63
53. Sengupta S, *et al.* DNA damage and prophage induction and toxicity of nitrofurantoin in *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* cells. *Mut Res* 1990;244:55-60
54. Quillardet P, *et al.* SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Genetics* October 1982;79;5971-5975

ANEXOS

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

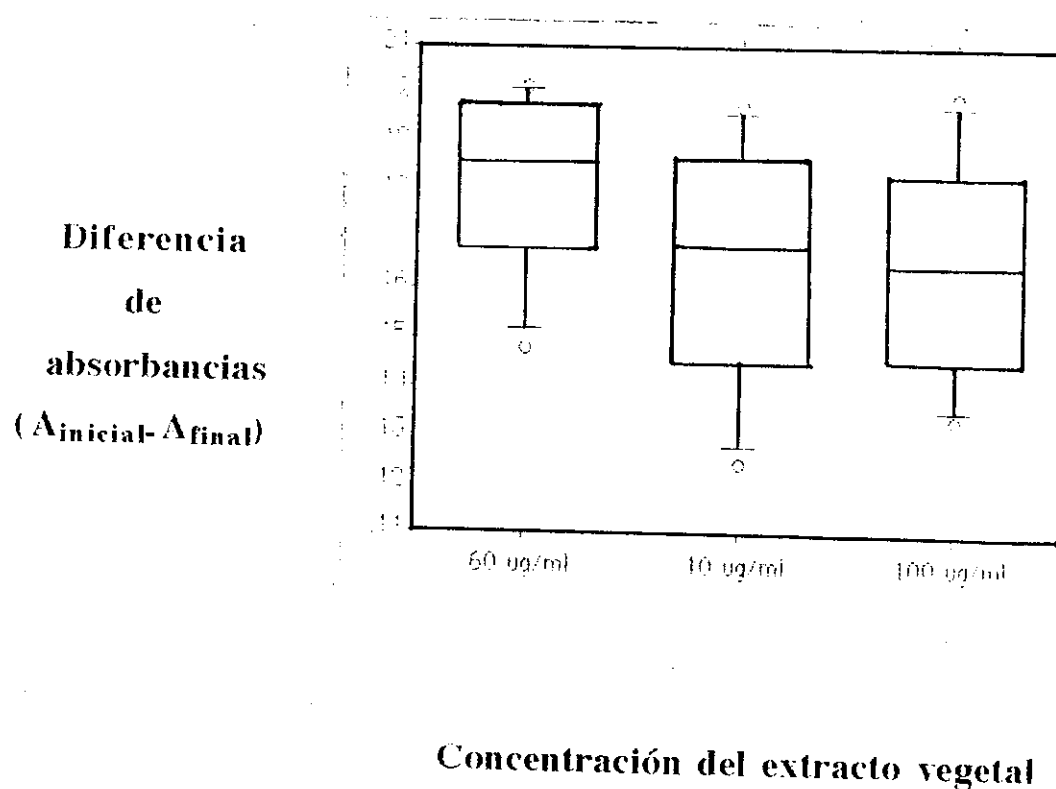
ANEXO No. 1

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	FAMILIA	No. DE HERBARIO	PARTE UTILIZADA
<i>Annona reticulata</i> (L.)	Anona	Annonaceae	344	Hoja
<i>Tecoma stans</i> (Juss. ex HBK)	Timboco	Bignoniaceae	399	Hoja
<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth	Nance	Malpighiaceae	369	Corteza
<i>Psidium guajava</i> (L.)	Guayaba	Myrtaceae	376	Hoja
<i>Simarouba glauca</i> (DC)	Aceituno	Simaroubaceae	380	Hoja

Nota: El herbario pertenece al Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos Farmaya.
 Todos los extractos son etanólicos.

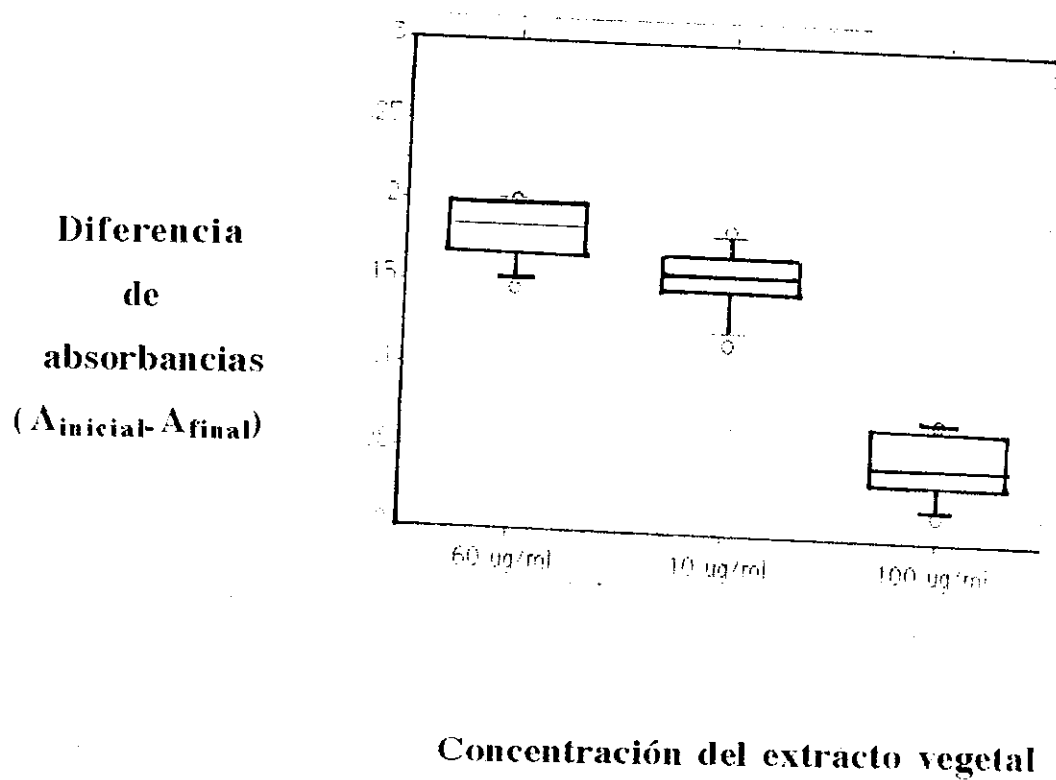
Anexo No. 3

Gráfica de los resultados del microensayo colorimétrico de interacción con el ADN del extracto etanólico de *Annona reticulata*

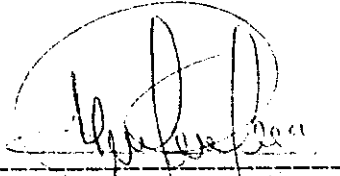


Donde la A_{final} es la absorbancia después de 24 hrs de incubación

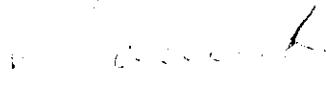
Gráfica de los resultados del microensayo colorimétrico de interacción con el ADN del extracto etanólico de *Byrsonima crassifolia*



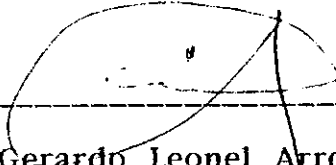
Donde la A_{final} es la absorbancia después de 24 hrs de incubación



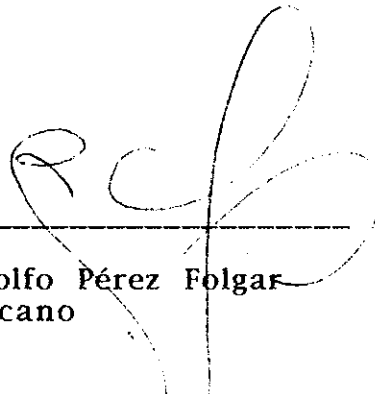
Br. Carmen Hérlinda Guzmán Téllez
Tesisista



Lic. Armando Cáceres Estrada
Asesor



Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Director



Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
Decano