

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

**Comparación de la Actividad Biológica de 10 extractos Vegetales
y 5 Fármacos utilizando Tres Bioensayos Toxicológicos**

Informe Final de Tesis

Presentado por:
Karen Rebeca Pérez Cifuentes

Para optar al título de
Química Farmacéutica

Guatemala noviembre del 2003

INDICE

	página
1. RESUMEN _____	2
2. INTRODUCCION _____	3
3. ANTECEDENTES _____	5
4. JUSTIFICACION _____	8
5. OBJETIVOS _____	9
6. HIPOTESIS _____	10
7. MATERIALES Y METODOS _____	11
8. RESULTADOS _____	23
9. DISCUSION DE RESULTADOS _____	28
10. CONCLUSIONES _____	35
11. RECOMENDACIONES _____	36
12. REFERENCIAS _____	40
13. ANEXOS _____	45

1. RESUMEN

Los productos fitofarmacéuticos pueden igualar a los mejores fármacos, y la apropiada extracción de los productos vegetales es una fuente potencial de medicamentos a la cual se le evalúa para evidenciar farmacológicamente los componentes biológicos.

El trabajo de investigación se realizó con el propósito de comparar y mejorar el pretamizaje de plantas con posible actividad biológica (comparando sensibilidad) y obtener resultados confiables y significativos en la búsqueda de componentes de plantas con dicha actividad. Las técnicas de pretamizaje comparadas fueron *Artemia salina* convencional (metodología descrita por Solís,1993), *Artemia salina* (ARTOXKIT) y *Thamnocephalus platyurus* (THAMNOTOXKIT). Dichas técnicas de pretamizaje pretenden orientar al farmacólogo, al químico y al farmacognosista hacia la utilización de métodos relativamente sencillos, que no involucren animales, que tengan bajo costo y que pueda realizarse un número grande de muestras en forma rápida, sencilla y reproducible.

Se comparó la susceptibilidad de las técnicas anteriormente mencionadas a 10 extractos vegetales: 5 con actividad anti-*Artemia* conocida (hoja de *Solanum americanum*, *Gliciridia sepium*, *Neurolaena lobata*, *Petiveria alliaceae*, *Ocimum micranthum*), 5 sin actividad anti-*Artemia* (*Curatella americana*, *Prunus barbata*, *Quercus crispifolia*, *Rhizophora mangle*, *Smilax domingensis*), y 5 fármacos (acetaminofén, secnidazol, cefalexina, amoxicilina y furosemida). Los tres organismos fueron susceptibles a la furosemida, acetaminofén, *P. alliaceae* y *O. micranthum*; no así a *C. americana*, amoxicilina, cefalexina y el secnidazol. La *A. salina* (Artoxkit) fue más susceptible a *O. micranthum* y furosemida y no presentó letalidad por *R. mangle*, *P. barbata*, *Q. crispifolia* ni *S. domingensis*. La *A. salina* convencional solamente presentó letalidad a *P. alliaceae*, *O. micranthum*, furosemida y acetaminofén. *T. platyurus* fue el más susceptible a *S. americanum*, *P. alliaceae*, *N. lobata*, *G. sepium* y acetaminofén.

Con base al análisis estadístico se concluyó que el bioensayo con *T. platyurus* es en general más susceptible que *A. salina* para realizar tamizaje de extractos de plantas.

2. INTRODUCCION

El estudio de compuestos bioactivos provenientes de plantas se ve muchas veces limitado por la falta de procedimientos de tamizaje apropiados, simples y rápidos. Existen muchos bioensayos que utilizan organismos vivos, ya sea animales, tejidos u órganos aislados, para determinar los efectos que están bajo observación. Sin embargo, no todos los laboratorios están suficientemente equipados, ni posee personal capacitado para realizar este tipo de pruebas (1).

Uno de los efectos que se observan al monitorear actividad biológica de productos fitofarmacéuticos es la letalidad, ya que la evaluación de la respuesta es simple: sobreviven o mueren. Un procedimiento para tamizaje de toxicidad no debería de requerir de mucha especialización del personal técnico y es esencial como una etapa preliminar en el estudio de compuestos bioactivos. Un organismo experimental simple que se ha utilizado ampliamente para este propósito es el camarón salino del Orden Crustacea, de la clase Anacostraca, *Artemia salina* (*A. salina*) (1).

En Guatemala se ha utilizado el método convencional de *A. salina* (microtécnica descrita por Solis, 1993) para detectar la citotoxicidad de extractos vegetales y fármacos. Sin embargo, ha surgido interés en diversas instituciones por buscar otras opciones disponibles a nivel mundial que involucren otro tipo de métodos con otros organismos. Entre ellas se puede mencionar una que utiliza *A. salina* (ARTOXKIT M) producida específicamente para su uso en microbioensayos de toxicidad, así como otro que utiliza *Thamnocephalus platyurus* (*T. platyurus*) (THAMNOTOXKIT F). Este último bioensayo es especialmente atractivo, por haberse encontrado en varios estudios, ser más susceptible que *A. salina*, además de no utilizar agua salada para la prueba (2).

.En el presente estudio se hizo una comparación paralela de tres bioensayos para determinar la actividad biológica de extractos vegetales y fármacos. Los bioensayos que se efectuaron fueron:

1. *A. salina* método “convencional”, (Solis, 1993). Se usó organismos disponibles comercialmente como alimento vivo para peces.
2. *A. salina*, un kit comercial (ARTOXKIT M), con una cepa especialmente seleccionada para tamizaje de toxicidad de sustancias puras y muestras ambientales.
3. *T. platyurus*, un kit comercial (THAMNOTOXKIT F), con un organismo especialmente seleccionado para tamizaje de toxicidad de sustancias puras y muestras ambientales.

Para dicha comparación se utilizaron diez extractos de plantas y cinco fármacos:

1. Cinco extractos de plantas con actividad citotóxica y anti-*Artemia* conocida: hoja de *S. americanum* (quilete), corteza de *G. sepium* (madrecacao), hoja de *N. lobata* (tres puntas), raíz de *P. alliaceae* (apacín), aceite de *O. micranthum* (albahaca).
2. Cinco extractos de plantas sin actividad citotóxica, ni anti-*Artemia* conocida: hoja de *C. americana* (lengua de vaca), hoja de *P. barbata*, hoja de *Q. crispifolia* (encino), corteza de *R. mangle* (mangle), rizoma de *S. domingensis*.
3. Cinco fármacos: acetaminofén, secnidazol, cefalexina, amoxicilina y furosemida que se conoce poseen actividad biológica, por lo tanto son citotóxicos para *A. salina*.

Con cada sustancia se corrieron los tres bioensayos y luego se compararon las concentraciones letales medias obtenidas (CL50) con cada uno. Se determinó, así mismo, cuál es el organismo más sensible a estas sustancias

probadas y las diferencias entre los bioensayos. Los ensayos se realizaron de acuerdo a los procedimientos estándar de operación propios de cada método (3, 4, 5).

3. ANTECEDENTES

Una de las primeras publicaciones sobre el uso de *A. salina* como un organismo de ensayo data de 1956. Desde entonces han habido muchos reportes

acerca de su uso para estudios ambientales, tamizaje de toxinas naturales y como tamizaje general para sustancias bioactivas de extractos vegetales (6).

A. salina tiene varias ventajas al ser utilizada para bioensayo, como por ejemplo: los quistes son viables por varios años, posee una alta sensibilidad a tóxicos, se utiliza un volumen pequeño de muestra, requiere de instrumentación poco compleja, es posible la miniaturización y es un bioensayo rápido, simple y económico (1, 7).

En otros estudios se ha utilizado *A. salina* para la determinación de concentración anestésica media, midiendo la potencia de anestésicos cuantitativamente con *A. salina*. También en el área farmacológica se utilizó para encontrar actividad farmacológica potencial de remedios caseros y como bioensayo para análogos de avermectina, ya que la mayoría de métodos disponibles consumen mucho tiempo y son poco convenientes. El método de *A. salina*, que detecta toxicidad general de compuestos orgánicos, se usó también para relacionarla con actividad antiparasitaria (8,9, 10).

En 1982 se publicaron propuestas de su utilización como bioensayo general, en viales para detectar constituyentes activos de plantas. En 1993 se propuso una modificación del método utilizando placas micropozos en lugar de viales para realizar la prueba (11, 12).

Se ha empleado el método de *A. salina* para tamizaje de citotoxicidad de plantas medicinales utilizadas por los indígenas Warao de Venezuela, plantas de Guatemala, plantas medicinales de Nigeria, plantas de Puerto Rico y de Savana africana (13, 14,15, 16, 17).

En esta misma línea de trabajo con plantas, ha sido útil para el pretamizaje de plantas con actividad antitumoral, para detectar fototoxicidad de las cumarinas de ciertas plantas y para pretamizaje de la actividad anti-*Tripanozama cruzi*. En

el área de la ecotoxicología se ha utilizado para detección de toxicidad de biotoxinas de cianobacterias, neurotoxinas y hepatotoxinas. Asimismo, se ha utilizado para actividad moluscida, antimicrobiana, antiartemia, citotoxicidad y para la detección de compuestos tóxicos para cultivos de microalgas y determinación de la toxicidad aguda en pinturas anti – pudrición o preservantes (18 19, 20, 21, 22, 23).

El crustáceo *T. platyurus*, a diferencia de *A. salina*, ha sido considerado principalmente como una “curiosidad científica”. Sin embargo, en los últimos años como resultado del creciente interés por *A. salina* en la aplicación ecotoxicológica, se iniciaron estudios en la Universidad de Gante, Bélgica en el Laboratorio de Investigación en Contaminación Acuática (LABRAP), para determinar el potencial del *T. platyurus* como candidato para la determinación de toxicidad en ensayos con agua dulce. Actualmente es ampliamente usado por muchos investigadores (2, 4).

T. platyurus se ha utilizado principalmente para estudios ecotoxicológicos: monitoreo de aguas de desecho, determinación de toxicidad de sedimentos de ríos, evaluación de toxicidad de herbicidas en la biota acuática, tamizaje de toxinas de cianobacterias, sustancias químicas y múltiples estudios de comparación de sensibilidad de varios métodos utilizados en ecotoxicología (2,4).

Las plantas utilizadas en esta investigación han sido analizadas previamente en estudios de evaluación de la biodiversidad vegetal de Guatemala, determinándose su actividad biocida. Dichas plantas fueron elegidas con base en resultados previos en los que se determinó su actividad anti-*Artemia* (24,25).

Información adicional sobre los organismos utilizados en los bioensayos, así como de las plantas y fármacos utilizados, se presenta en el **Anexo**.

4. JUSTIFICACION

Muchos compuestos naturales son aislados, caracterizados y los resultados divulgados en publicaciones sin tener ningún estudio de evaluación biológica que indique si poseen efectos sobre organismos vivos. Sus actividades biológicas útiles pueden permanecer desconocidas por años. Sin la información biológica correspondiente, el descubrimiento de nuevos constituyentes medicinales vegetales es nada más que pura fitoquímica. La búsqueda para encontrar actividades farmacológicas específicas necesita de muchos bioensayos que cuestan mucho más dinero del que está disponible para obtención de plantas y fraccionamiento de sus compuestos activos. Además, la búsqueda de actividades específicas muchas veces pasa por alto otras actividades útiles que no son detectadas, o son ignoradas en el proceso de tamizaje. Es por ello que existe una necesidad de contar con bioensayos generales y confiables que puedan detectar una amplia gama de actividades farmacológicas de plantas y que sean fáciles y económicos de utilizar, para guiar el tamizaje y fraccionamiento fitoquímico (10).

Ya que muchas de las plantas activas son tóxicas a concentración elevada, un posible acercamiento para desarrollar un bioensayo general efectivo puede ser simplemente buscar sustancias que son tóxicas para sistemas zoológicos. En la búsqueda de este ensayo se inició el uso de *A. salina*, método que actualmente es utilizado rutinariamente para la búsqueda de actividad biológica. Así mismo, se inicio el uso de otro crustáceo *T. platyurus*, utilizado para detectar biotoxinas entre otras cosas (4, 10).

Con el presente estudio, por primera vez a nivel mundial, se compararon los resultados de las metodologías mencionadas en la introducción con el fin de mejorar el tamizaje de plantas con actividad biológica (comparar sensibilidad), y obtener resultados confiables y significativos en la búsqueda de componentes de plantas bioactivas.

5. OBJETIVOS

5.1 General

5.1.1 Contribuir al estudio de metodologías útiles en el tamizaje de plantas con actividad biológica.

5.2 Específicos

5.2.1 Evaluar tres metodologías distintas útiles en el tamizaje de plantas con actividad biológica.

5.2.2 Comparar los métodos con respecto a diversos parámetros como: sensibilidad, duración y disponibilidad del ensayo.

6. HIPOTESIS

Existen diferencias significativas en la sensibilidad entre las tres metodologías que se utilizarán para determinar actividad biológica de plantas.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo

7.1.1 Universo de Estudio

El universo fue constituido por extractos vegetales con actividad anti-*Artemia*, extractos vegetales sin actividad anti-*Artemia* y fármacos con actividad citotóxica conocida. Se utilizaron quistes de *A. salina* de venta comercial y kits de *A. salina* y *T. platyurus* (ARTOXKIT M Y THAMNOTOXKIT F)

7.1.2 Muestra

La muestra fue constituida por extractos etanólicos de: *Solanum americanum* (hoja), *Gliciridia sepium* (corteza), *Neurolaena lobata* (hoja), *Petiveria alliacea* (raíz), *Curatella americana* (hoja), *Prunus barbata* (hoja), *Quercus crispifolia* (hoja), *Rhizophora mangle* (corteza), *Smilax domingensis* (rizoma) y *Ocimum micranthum* (aceite). Así mismo se utilizaron los fármacos acetaminofén, secnidazol, cefalexina, furosemida y amoxicilina.

7.2 Recursos

7.2.1 Humanos

- Tesista: Br. Karen Rebeca Pérez
- Asesores: Lic. Pablo Mayorga
Dra. Ana Lucía Valle
- Colaboración: Lic. Armando Cáceres y Prof. Dr. Guido Persoone (U. de Gante, Bélgica)
- Patrocinadores: Microbiotests Inc, Servicios y Productos Ambientales (SEPRA)
- Donadores: Quirsa.

7.2.2 Físicos

7.2.2.1 Materiales

Erlenmeyer
Percoladores
Vasos de precipitar
Viales con tapadera de rosca
Pipetas automáticas con puntas desechables
Tubos de ensayo
Micropipetas desechables
Placas de 96 pozos y de 24 pozos
Cajas de Petri de plástico y de vidrio
Espátulas de acero inoxidable y plástico
Gradilla
Papel encerado
Parafilm
Papel filtro
Papel pH

7.2.2.2 Equipo

Balanza analítica (Mettler, Suiza)
Refrigerador
Mezclador / calentador (Corning, EE.UU.)
Balanza semianalítica (Sartorius, Alemania)
Incubadora bacteriológica (Labline, China)
Incubadora con Fuente de luz (Novital, Italia y Jenway, Inglaterra)
Estereoscopio (CETI, Bélgica)
Medidor de Lux (PANTEC, Italia)
Agitador tipo Vortex (GEMMY, China)

7.2.2.3 Reactivos

Etanol 70%

Metanol

Agua destilada

Extractos de las diez plantas seleccionadas

Principio activo (grado USP) de los cinco fármacos seleccionados

Sal de mar

Sales prepesadas de los TOXKITS: Cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, bicarbonato de sodio y ácido bórico.

Otras sustancias: Dimetilsulfóxido (DMSO)

Sustancia tóxica estándar para Toxkits: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) (Merck, Alemania)

7.2.3 Institucionales

7.2.3.1 Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica; Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

7.2.3.2 Laboratorio SEPRA

7.3 Método

Se utilizaron tres metodologías de bioensayos de letalidad

7.3.1 Procedimientos Estándar de Operación ARTOXKIT M y THAMNOTOXKIT F (3,4)*

Los procedimientos estándar de operación de ambas metodologías son similares y difieren únicamente en algunos puntos. Estas diferencias se indicaran explícitamente.

* traducidos del inglés textualmente al español por K. Pérez, con autorización escrita del autor

7.3.1.1 Preparación del Agua de Dilución y Eclosión de los Quistes: Día 0

7.3.1.1.1 Preparación del Agua de Mar Estándar para ARTOXKIT M

Los viales con sal y soluciones concentradas de sales provistos en el kit, permiten la preparación de 1 lt de agua de mar estándar (artificial) con una salinidad normal de agua de mar (26g/L). La solución estándar de agua de mar fue utilizada para medio de eclosión de los quistes y como medio de dilución para la serie de dilución de las sustancias experimentales.

Se llenó un balón volumétrico de 1 litro con aproximadamente 800ml de agua desionizada. Luego se añadió, agitando constantemente, los contenidos completos de los viales No. 1 (cloruro de sodio), No.2 (cloruro de potasio), No.3 (cloruro de calcio), No.4 (cloruro de magnesio), No.5 (sulfato de magnesio), No.6 (bicarbonato de sodio) y No. 7 (ácido bórico), respetando esta secuencia. Por último se añadió agua desionizada hasta la marca de 1000ml y homogenizó el medio.

La solución de un litro del agua de mar estándar se almacenó en la refrigeradora (en oscuridad). Se tuvo cuidado que el medio refrigerado alcanzara la temperatura ambiente antes de utilizarlo.

7.3.1.1.2 Preparación del Agua Dulce para THAMNOTOXKIT F

Los viales con soluciones concentradas de sales, similares a las utilizadas para preparar **ARTOXKIT M**, exceptuando que no se utilizó cloruro de sodio, cloruro de magnesio ni ácido bórico, permitieron la preparación de 1 litro de agua dulce estándar (artificial). La solución estándar de agua, fue utilizada como medio de eclosión de los quistes y como medio de dilución para la serie de dilución de las sustancias experimentales. Los procedimientos de preparación y de almacenaje son iguales a los utilizados para ARTOXKIT M.

7.3.1.1.3 Eclosión de los Quistes

La eclosión de los quistes se inició 24 horas antes de iniciar las pruebas de toxicidad en *A. salina* y 20-22 horas antes de las pruebas en *T. platyurus*. Se siguieron los siguientes pasos:

1. Aireado del medio de dilución que se utilizó para la eclosión (30 minutos).
2. Prehidratación de los quistes introduciendo 1ml de agua de disolución en el vial con quistes y agitando a intervalos regulares durante 30 minutos.
3. Vaciado del contenido del vial con quistes en una caja de Petri asegurándose que la mayoría de quistes fueran transferidos.
4. Se añadió 40ml de agua estándar en la caja de Petri, agitando suavemente con movimiento circular para distribuir homogéneamente los quistes.
5. Se cubrieron las cajas Petri, exponiéndolas a una fuente de luz fluorescente (1000-4000lux) por una hora e incubó a 25°C en la oscuridad por 24 horas para *A. salina*. *T. platyurus* se incubó a 25°C con iluminación constante (4000 lux) entre 20-22 horas.

7.3.1.2 Preparación de la Serie de Dilución de la Sustancia (tóxico), Llenado de Placas, Pruebas de Determinación de Rango y Definitiva e Incubación: Día 2

7.3.1.2.1 Preparación de la Serie de Dilución del Tóxico

Aunque la toxicidad aproximada de los extractos y fármacos es conocida, no se procede directamente a la Prueba Definitiva. Se llevó a cabo primero la Prueba para Determinación de Rango.

Para la Prueba para Determinación de Rango se modificó el Procedimiento Estándar de Operación se preparó una serie de dilución: 1000mg/l, 100mg/l, 10mg/l, 1mg/l y 0.1mg/l de cada sustancia (**Cuadro 1**). Para algunas sustancias que no presentaron actividad en este rango, se duplicaron las concentraciones de la serie de dilución.

Cuadro 1. Serie de dilución del compuesto químico

Tubo de Ensayo	Concentración del Químico (mg / l)
1	1000
2	100
3	10
4	1
5	0.1

7.3.1.2.2 Llenado de la Placa - Prueba de Determinación de Rango

Las pruebas se llevaron a cabo con organismos vivos y vigorosos, *A. salina* de 24 horas y *T. platyurus* de 20-22 horas.

Cada dilución de tóxico (en triplicado) fue transferida a los pozos de una columna en la placa multipozos. Los pozos se numeraron de 1 a 6 horizontalmente y de A a D verticalmente. La distribución de las soluciones experimentales siempre se llevó a cabo empezando del control (izquierda, columna 1) hacia la concentración más elevada (derecha, columna 6). El control se realizó añadiendo 1 ml de agua de dilución a cada pozo de la columna 1 (pozos A1, B1, C1, D1), se añadió también 1ml de cada dilución de la sustancia en el pozo correspondiente.

Transferencia de Larvas a los Pozos

La transferencia de las larvas a la placa multipozos se realizó en dos pasos:

- a. Transferencia de las larvas de la caja Petri a los pozos de enjuague de la placa multipozos (A1 a A6).
- b. Transferencia de las larvas de los pozos de enjuague a los 3 pozos con 1ml cada uno de dilución.

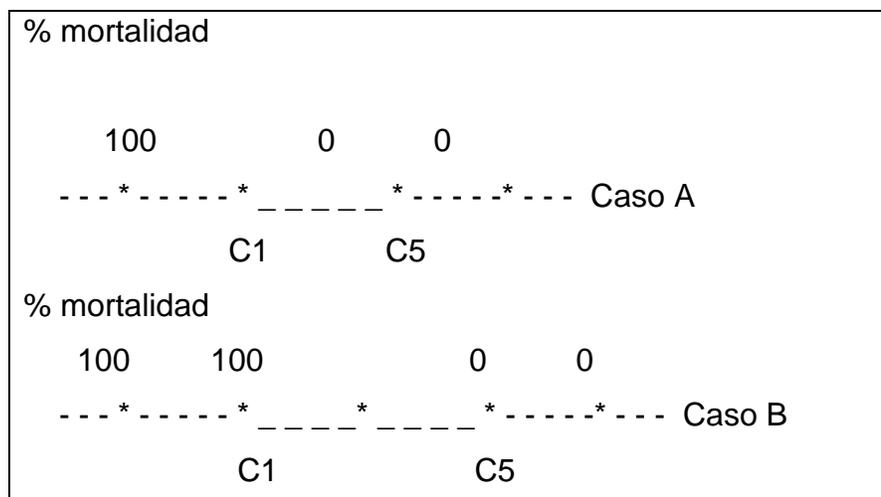
Para esto se sacó la caja Petri de la incubadora y se esperó aproximadamente 5 minutos para permitir que los nauplios se congregaran. Los siguientes pasos fueron ejecutados bajo un microscopio de disección con un aumento de 10-12x.

1. Se colocó la caja Petri debajo del microscopio y utilizando una micropipeta, se transfirieron aproximadamente 50 larvas de la caja Petri a caja pozo de enjuague (cada pozo de la fila D), en la siguiente secuencia: D1 (control), D2, D3, D4, D5 y D6 (incrementando la concentración del tóxico). Se trató de transferir el menor volumen de líquido posible de la caja Petri a los pozos, para evitar dilución.
2. Se colocó la placa multipozos bajo el microscopio de disección y se transfirieron 10 nauplios a cada pozo de la concentración correspondiente.
3. Se repitió esta transferencia para las columnas 2, 3, 4, 5 y 6 (en esta secuencia).

7.3.1.2.3 Prueba Definitiva

La serie de diluciones ensayadas en la Prueba Definitiva abarcó el rango de la concentración más baja produciendo 100% de mortalidad y la concentración más alta produciendo 0% de mortalidad en la Prueba de Determinación de Rango. Este rango podía abarcar un orden de magnitud (caso A) o dos ordenes de magnitud (caso B) como se indica en el **Cuadro 2**. Este rango de concentración será llamado C1-C5.

Cuadro 2: Representación diagramática de el 100% y el 0% del rango de concentración de mortalidad, como se ha determinado en la Prueba de Determinación de Rango



Caso A : C1-C5 abarca un orden de magnitud

En este caso la concentración C1 se preparó en duplicado (2 tubos de ensayo).

1. Se añadieron los volúmenes de agua de dilución como se indica en el **Cuadro 3**, a los tubos de ensayo respectivos.
2. Se añadieron los volúmenes del tóxico de concentración C1 como se indica en el **Cuadro 3**.
3. Los tubos de ensayo se taparon con parafilm y agitaron.

Cuadro 3. Serie de dilución C1 - C5

Tubo de Ensayo	Agua de Dilución (ml)	C1 (ml)
C1	0	10
C2	4.4	5.6

C3	6.8	3.2
C4	8.2	1.8
C5	9.0	1.0

4. Se calculó la concentración actual de C1, C2, C3, C4 y C5 (utilizando la siguiente figura para el cálculo de CL 50)

$$C1 = \dots\dots\dots \text{ mg/l}$$

$$C2 = 0.56 \times C1 = \dots\dots \text{ mg/l}$$

$$C3 = 0.32 \times C1 = \dots\dots \text{ mg/l}$$

$$C4 = 0.18 \times C1 = \dots\dots \text{ mg/l}$$

$$C5 = 0.10 \times C1 = \dots\dots \text{ mg/l}$$

5. Se procedió a llenar la placa, según el procedimiento descrito en la sección **7.3.1.2.2**

Caso B : C1-C5 abarca dos orden de magnitud

En este caso la concentración C1 se preparó una vez.

1. Se añadieron los volúmenes de agua de dilución como lo indica el **Cuadro 4** a los tubos de ensayo respectivos.
2. Se añadieron los volúmenes del tóxico de concentración C1 como lo indica el **Cuadro 4**.
3. Se taparon y agitaron los tubos de ensayo.

Cuadro 4: Serie de dilución C1 - C5

Tubo de Ensayo	Agua de Dilución (ml)	C1 (ml)
C1	0	10
C2	6.8	3.2

C3	9.0	1.0
C4	9.7	0.3
C5	9.9	0.1

4. Se calculó la concentración actual de C1, C2, C3, C4 y C5 (estas figura se necesitan para el calculo de DL 50)

C1 =..... mg/l

C2 = 0.32 x C1 =..... mg/l

C3 = 0.10 x C1 =..... mg/l

C4 = 0.03 x C1 =..... mg/l

C5 = 0.01 x C1 =..... mg/l

5. Se procedió a llenar la placa, según el procedimiento descrito en la sección **7.3.1.2.2**

7.3.1.2.4 Incubación de la Placa de Ensayo

Se colocó una tira de parafilm sobre la placa y se puso la cubierta sobre ella. Luego se colocó la placa multipozos en la incubadora a 25 °C en la oscuridad, por 24 y 48 horas para *A. salina* y 24 horas para *T. platyurus*.

7.3.1.3 Evaluación de los Resultados: Día 3

Se sacó la placa de la incubadora y colocó debajo del microscopio de disección. Se verificaron todos los pozos de las filas A, B y C, registrándose el numero de larvas muertas. Las larvas fueron consideradas muertas sí no mostraban ningún movimiento después de 10 segundos de observación. Si la mortalidad de los controles excedía el 10%, el bioensayo hubiera sido considerado inválido y repetido de nuevo.

Se calculó el porcentaje de mortalidad para cada dilución , para utilizar esta información en el cálculo de CL50, por medio del método computarizado USEPA 1985 (26).

7.3.3 Procedimiento Estándar de Operación *A. salina* convencional (basado en el ensayo descrito por Solis *et al.*, 1993)

A este método se le llamara "convencional" en el resto del trabajo.

7.3.3 .1 Preparación del agua de mar

Para la preparación del medio de dilución se siguieron los siguientes pasos:

1. Disolución de 35 g de la sal de mar en un litro de agua destilada.
2. Se marcó el vaso de precipitar para indicar el volumen de agua.
3. Se hirvió por 30 minutos y completó el volumen que se evaporó según la marca.
4. Se filtró y refrigeró hasta el momento de usar.

7.3.3.2 Cultivo de *A. salina*

Se colocó el agua en la "pecera" y agregaron 40 mg de huevecillos en el área cerrada (lado oscuro). Se incubó por 48 horas a temperatura ambiente y con luz artificial incandescente. Al eclosionar, los nauplios (larvas) pasaron al área abierta de la pecera (lado con luz). Se sacaron a las 24 horas las larvas que eclosionaron y se utilizaron las que eclosionaron en las ultimas 24 horas.

7.3.3.3 Determinación de la Citotoxicidad

Para la determinación de la citotoxicidad se pesó 20mg del extracto a ensayar y disolvió con 10ml de agua de mar. Se agregaron por triplicado en una microplaca (96 pozos): 100 μ l del extracto disuelto + 100 μ l de agua de mar con 10-15 nauplios. Se realizó un control negativo con: 100 μ l de agua de mar, 100 μ l

de agua de mar con 10-15 nauplios. Luego se incubó a temperatura ambiente con luz artificial (incandescente) por 24 horas.

En el caso de *O. micranthum*, el aceite se solubilizó utilizando DMSO (2mg de aceite/40 μ L de DMSO/1.9mL de agua de mar). Se realizó el control con dicha sustancia, comprobando que la toxicidad no sería debido a ella.

A las 24 horas se contaron en el estereoscopio o microscopio el número de nauplios muertos. Se agregó metanol a los pozos, esperando 15 minutos, contando de nuevo todos los nauplios. Si se observaban nauplios muertos en el control negativo la prueba no era válida y había que repetirla de nuevo.

7.3.3. 4 Interpretación

Se calculó el % de nauplios muertos:

1. Sumando el número de camarones muertos en los tres pozos (X).
2. Sumando el número total de camarones en los tres pozos (Y).
3. Dividiendo X dentro de Y y multiplicando por 100.

Si el % de camarones muertos era mayor del 50%, se repetía la prueba utilizando concentraciones de 1.0, 0.5 y 0.25 mg/ml, obteniendo los valores de X y Y en cada concentración y determinando el valor de CL50 con el programa de computadora Finney. Sin embargo, para la comparación del estudio se corrieron los resultados utilizando el método computarizado de la USEPA (26).

7.5 Diseño de la Investigación

La actividad citotóxica con *A. salina* y *T. platyurus* se expresó como CL50 o concentración letal media, es decir, la concentración que mata el 50 % de los nauplios. Se realizó una comparación de los resultados obtenidos con el fin de analizar qué método era más sensible. Así mismo se compararon varios parámetros tales como la disponibilidad, tiempo, etc. que requería cada

metodología por ser éste un aspecto muy importante en el uso de métodos de investigación. El ensayo, por conveniencia, consistió en un análisis (triplicado) por extracto o fármaco (por limitación de kits de *A. salina* y *T. platyurus*) para cada tratamiento. Se realizó un diseño de bloques al azar como se indica en el **Cuadro 5**.

Cuadro 5. Diseño de Bloques al Azar

	<i>A. salina</i> kit	<i>A. salina</i> convencional	<i>T. platyurus</i>
Sustancia 1 (fármaco o extracto)	✓	✓	✓
⋮			
Sustancia 15 (fármaco o extracto)	✓	✓	✓

7.5 Análisis Estadístico de la Investigación

Se realizó un análisis de varianza de dos vías con el programa estadístico para Macintosh StatView 1.5, ya que la hipótesis aseveraba que las tres metodologías poseían diferencias significativas de sensibilidad.

7.5.1 Hipótesis Nula

La CL50 de cada ensayo es igual en los tres métodos utilizados.

Si existía diferencia significativa se realizarían comparaciones pareadas por la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (LSD, con el programa estadístico antes mencionado) .

8. RESULTADOS

8.1 Pruebas preliminares

En la prueba convencional de *A. salina* (Solis *et.al.*,1993) se realiza un paso preliminar que consiste en una prueba de letalidad con una solución de 1 mg/l. Si no hay letalidad, el extracto es considerado sin actividad. Las pruebas preliminares con método convencional de *A. salina* (Solis *et.al.*, 1993) no se

realizaron debido a que los extractos utilizados en la investigación fueron proporcionados por el Departamento de Citohistología, y probados con anterioridad por ellos. Determinaron que la hoja de *Solanum americanum* (quilete), corteza de *Gliciridia sepium* (madrecacao), hoja de *Neurolaena lobata* (tres puntas), raíz de *Petiveria alliaceae* (apacín) y aceite de *Ocimum micranthum* (albahaca) sí poseen actividad citotóxica. Asimismo, comprobaron que la hoja de *Curatella americana* (lengua de vaca), hoja de *Prunus barbata*, hoja de *Quercus crispifolia* (encino), corteza de *Rhizophora mangle* (mangle) y rizoma de *Smilax domingensis* no poseen actividad citotóxica contra *A. salina*.

Los Toxkits requieren también de una prueba preliminar para encontrar el rango de concentración en la que se puede encontrar la CL50 (Ensayo de Rango de Actividad). Se observó que 7 de 15 sustancias (*S. americanum*, *G. sepium*, *N. lobata*, *P. alliaceae*, *O. micranthum*, furosemida y acetaminofén) tuvieron actividad citotóxica con Artoxkit y 11 de 15 sustancias (*S. americanum*, *G. sepium*, *N. lobata*, *P. alliaceae*, *O. micranthum*, *P. barbata*, *Q. crispifolia*, *R. mangle*, *S. domingensis*, furosemida y acetaminofén) con Thamnotoxkit. En el **Cuadro 6** se presentan los resultados de estas pruebas de búsqueda de rango con los Toxkits.

8.2 Pruebas definitivas (determinación de Concentración letal media -CL50)

Los valores de CL50 (expresados en mg/l o ppm) fueron obtenidos con métodos computarizados de la USEPA (principalmente Moving Average, y cuando fue necesario, Binomial Test o Probit). Si una muestra tuvo actividad con más de 1000 ppm significa que no hay actividad.

Cuadro 6. Pruebas preliminares (rango de actividad) de extractos vegetales y fármacos con bioensayos con *A. salina* y *T. platyurus*

Extracto/ Sustancia	Citotoxicidad con <i>A. Salina</i> (Artoxkit)	Citotoxicidad con <i>T. platyurus</i> (Thamnotoxkit)	Rango de Actividad en mg/L	
			<i>A. salina</i>	<i>T. platyurus</i>
Con Actividad anti-Artemia conocida				

<i>S. americanum</i>	+	+	100-1000	10– 1000
<i>O. micranthum</i>	+	+	10-1000	10-1000
<i>P. alliaceae</i>	+	+	10-1000	10-1000
<i>G. sepium</i>	+	+	200-2000	100-1000
<i>N. lobata</i>	+	+	200-2000	100-1000
Sin actividad anti-Artemia conocida				
<i>C. americana</i>	-	-	-	-
<i>R. mangle</i>	-	+	-	10-1000
<i>P. barbata</i>	-	+	-	100-1000
<i>Q. crispifolia</i>	-	+	-	100-1000
<i>S. domingensis</i>	-	+	-	10-1000
Fármacos				
Furosemida	+	+	10 – 1000	100 – 1000
Amoxicilina	-	-	-	-
Cefalexina	-	-	-	-
Secnidazol	-	-	-	-
Acetaminofén	+	+	10-1000	10-100

+ = presenta actividad

- = no presenta actividad

Los tres organismos fueron susceptibles a la furosemida, acetaminofén, *P. alliaceae* y *O. micranthum*; no así a *C. americana*, amoxicilina, cefalexina y el secnidazol. La *A. salina* (Artoxkit) fue más susceptible a *O. micranthum* y furosemida y no presentó letalidad por *R. mangle*, *P. barbata*, *Q. crispifolia* ni *S. domingensis*. La *A. salina* convencional solamente presentó letalidad a *P. alliaceae*, *O. micranthum*, furosemida y acetaminofén. *T. platyurus* fue el más susceptible a *S. americanum*, *P. alliaceae*, *N. lobata*, *G. sepium* y acetaminofén. En el **Cuadro 7** se muestran los resultados (CL50) obtenidos en las pruebas definitivas con *A. salina* y *T. platyurus* con los diferentes extractos y fármacos.

Cuadro 7. Concentraciones letales medias (CL50) y límites de confianza de extractos vegetales y fármacos en bioensayos con *A. salina* y *T. platyurus*

Extracto/ Sustancia	Artoxkit 24h CL50*	Artoxkit 48h CL50*	Thamnotoxkit CL50*	<i>Artemia salina</i> 24h CL50*
Con Actividad anti-<i>Artemia</i> conocida				
<i>S. americanum</i>	1 (0.77-2.81)	565 (380-845)	219 (173-281)	0
<i>O. micranthum</i>	32 (23-43)	25 (20-32)	101 (73-139)	405(302-509)
<i>P. alliaceae</i>	481 (367-669)	135 (100-187)	12 (9-14)	228(157-271)
<i>G. sepium</i>	0	0	492 (399-587)	0
<i>N. lobata</i>	0	902(794 –1032)	251(225-274)	0
Sin actividad anti-<i>Artemia</i> conocida				
<i>C. americana</i>	0	0	0	0
<i>R. mangle</i>	0	0	84 (63–110)	0
<i>P. barbata</i>	0	0	405 (344–486)	0
<i>Q. crispifolia</i>	0	0	201(177–226)	0
<i>S. domingensis</i>	0	0	70 (52-92)	0
Fármacos				
Furosemda	566	77 (58-102)	581 (523-647)	308(182-403)
Amoxicilina	0	0	0	0
Cefalexina	0	0	0	0
Secnidazol	0	0	0	0
Acetaminofén	320 (100-1000)	163 (100-1000)	34(30-39)	471(396-554)

* CL50 >1000 ppm = 0

8.3 Análisis Estadístico

Las comparaciones fueron realizadas por separado con los tres grupos de sustancias analizadas: con actividad anti-*Artemia* conocida, sin actividad anti-*Artemia* conocida y fármacos. Para la comparación se utilizaron los resultados de Artoxkit de 48 horas y de *A. salina* convencional de 24 horas. El programa estadístico computarizado utilizado para analizar los resultados fue StatView 1.5.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías porque la hipótesis asevera que las tres metodologías presentarían diferencias significativas de sensibilidad. Como hubo diferencia significativa, se realizaron comparaciones pareadas por la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (MDS). Esto se detalla a continuación.

El análisis de varianza de los resultados de los tres bioensayos para las sustancias con actividad anti-*Artemia* y de fármacos presentaron valores P de 0.613 y 0.5628, respectivamente. Por lo tanto, se demuestra que no hay diferencia significativa (diferencia significativa $P < 0.05$) entre los tres bioensayos. Sin embargo, el análisis de varianza de los extractos sin actividad anti-*Artemia* presentó un valor P 0.0472, demostrando que sí hay diferencia significativa. Debido al valor P obtenido, se realizó una comparación entre los bioensayos (MDS- mínima diferencia significativa). Esta comparación se presenta por grupos en el **Cuadro 8**.

Cuadro 8. MDS - ANOVA de una vía comparando CL50 de extractos sin actividad anti-*Artemia*

Comparación	Diferencia Significativa	PLSD Fisher
Artoxkit-Thamnotoxkit	-152	133.726*
Artoxkit- <i>A. salina</i>	0	133.726
Thamnotoxkit- <i>A. salina</i>	152	133.726*

***Significativo a 95%**

Según el análisis estadístico, hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos con Thamnotoxkit y Artoxkit y entre Thamnotoxkit y *A. salina* convencional. Entre Artoxkit y *A. salina* convencional no hay diferencia significativa estadísticamente. Se puede observar en los resultados (**Cuadro 7**) que existe diferencia, sin embargo, esta diferencia no es mínima, por lo tanto no es determinada como diferencia significativa mínima.

Sin embargo, simplemente observando el **Cuadro 7**, el hecho que *T. platyurus* presentara más susceptibilidad que *A. salina* y haya mostrado toxicidad en extractos que no mostraron toxicidad para ninguno de los dos bioensayos con *A. salina*, resulta obvio que es una prueba que proporciona información que los ensayos con *A. salina* no hacen. De la misma manera se puede decir de los extractos con actividad conocida que no afectaron a *A. salina* convencional pero sí afectaron a Artoxkit. Es importante mencionar que el único extracto que presentó mayor actividad *A. salina* que *T. platyurus* es el *O. micranthum*, pudiendo deberse esto al DMSO, medió de solución del extracto.

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Se puede observar en los resultados, que *A. salina* convencional y Artoxkit muestran resultados diferentes. Así mismo, se evidencia que *T. platyurus* es más sensible que Artoxkit y *A. salina* convencional, para el tamizaje de plantas con actividad biológica. Sin embargo, al realizar la comparación estadística de los tres bioensayos se logró probar únicamente diferencia significativa de los bioensayos

en el análisis de extractos sin actividad anti-*Artemia*. Dichos resultados pueden deberse a que las diferencias que presentaban los valores de CL50 fueron grandes, por lo tanto fue imposible determinar una mínima diferencia significativa.

Al comparar los resultados entre Artoxkit - *A. salina* convencional, se puede observar que sólo 2 de los 5 extractos con actividad anti-*Artemia* conocida tuvieron algún efecto en *A. salina* convencional, mientras que éstos y otros 2 más tuvieron actividad con Artoxkit. Un extracto no mostró actividad en ninguno de los 2 ensayos, quizás porque el extracto presentó concentraciones bajas de principios activos o podría haber perdido actividad biológica por haber estado refrigerado durante mucho tiempo. En todo caso, Artoxkit tuvo LC50 más bajas (más susceptibilidad) e intervalos de límites de confianza estrechos (exactitud y poca variabilidad). Sin embargo, a pesar de esto, la diferencia no fue significativa según el análisis estadístico. Pero para fines prácticos, con los resultados de este estudio, se puede asumir que Artoxkit es más susceptible que *A. salina* convencional. *A. salina* convencional tuvo susceptibilidad a 4 de las 15 sustancias evaluadas y Artoxkit a 6 de las 15 sustancias evaluadas.

En la comparación de Thamnotoxkit - Artoxkit y *A. salina* convencional, se pudo observar que 4 de los 5 extractos sin actividad anti-*Artemia* conocida mostraron actividad contra Thamnotoxkit, mientras ninguno mostró actividad contra los dos ensayos con *A. salina*. Así mismo, en los extractos con actividad anti-*Artemia* presentó mayor susceptibilidad. Estadísticamente y para fines prácticos, Thamnotoxkit es más susceptible que cualquiera de los bioensayos con *A. salina*. Esto es una gran ventaja, pues si se usa este tipo de bioensayo como prueba de pretamizaje, se obtienen resultados más significativos que con *A. salina*. De hecho, se han realizado pruebas con estos extractos sin actividad anti-*Artemia* conocida en organismos patógenos, y resulta que presentan propiedades biocidas. En el **Cuadro 9** se muestran resultados del tamizaje de algunas de las especies con bioensayos micrométricos. Dichos bioensayos están enfocados a los

estudios de fraccionamiento bioguiado y evaluación preclínica con ensayos de la actividad *in vitro* de las plantas contra organismos patógenos.

Cuadro 9. Ensayos de algunos de los extractos utilizados contra Organismos Patógenos*

Extracto	Organismos**						
	A	B	C	D	E	F	G
Con Actividad anti-Artemia conocida***							
<i>S. americanum</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	>1
<i>O. micranthum</i>	1	>1	0.2	1	nd	0.9	>1
<i>P. alliaceae</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	>1
<i>N. lobata</i>	> 1	> 1	nd	> 1	> 1	0.5	nd
Sin actividad anti-Artemia conocida***							
<i>P. barbata</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
<i>Q. crispifolia</i>	0.5	0.2	0.5	0.2	nd	>1	>1
<i>S. domingensis</i>	+	+	+	+	+	-	>1

* Datos proporcionados por el Depto. de Citohistología de Fac. CC.QQ. y Farmacia

** MICROORGANISMOS= A Bacteria Gram - (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*)
 B Bacterias Gram + (*B. subtilis*, *S. aureus*)
 C *M. smegmatis*
 D Levaduras (*C. albicans*, *C. neoformans*)
 E Hongos (*A. flavus*, *T. rubrum*)
 F Protozoos (*L. brasiliensis*, *L. maxicana*, *T. cruzi*)
 G Larvas de *A. aegypti* y *A. Albicamanus*

***CIM = Concentración mínima inhibitoria en mg/ml ; nd:no determinado; +: si presenta actividad ;
 - : no presenta actividad

Se puede observar, así mismo, que los resultados con Thamnotoxkit presentan LC50 más bajas (más susceptibilidad) e intervalos de límites de confianza estrechos (exactitud y poca variabilidad).

Los organismos presentaron actividad con furosemida y acetaminofén. Es importante mencionar que probablemente no mostraron actividad alguna con amoxicilina, cefalexina y secnidazol, debido a que el mecanismo de acción de los fármacos no produce un efecto agudo de letalidad a los organismos y quizá por la diferencia fisiológica y metabólica entre los crustáceos y microorganismos

patógenos sobre los que actúan los fármacos (ver detalles de los fármacos en **Anexo**).

Las diferencias observadas en los resultados pueden deberse a factores/condiciones discutidos a continuación. Por motivos de espacio y facilidad de lectura, esta información se presenta en el **Cuadro 10**. Aquí se comparan varios parámetros metodológicos, desde la selección de organismos, hasta la forma de determinar las CL50.

Cuadro 10. Comparación de aspectos metodológicos de los 3 bioensayos utilizados

Parámetro	A. salina	Artoxkit M	Thamno-toxkit F	Observaciones
Quistes producidos bajo control de calidad y específicamente para ensayos de letalidad	No	Si	Si	Las cepas de los kits son cepas seleccionadas especialmente para pruebas de toxicidad debido a su susceptibilidad. La <i>A. salina</i> del ensayo convencional, es producida para ser alimento vivo de peces de acuario.
Medio estándar para eclosión y para bioensayo	Agua salada	Agua salada	Agua dulce	La mayor ventaja de la utilización del <i>T. platyurus</i> en los ensayos es que el medio utilizado provee mayor disolución del extracto/ sustancia, lo que implica disolución de los principios activos. Esto conlleva a mayor biodisponibilidad de los mismos. El agua salada es sobresaturada pudiéndose mejorar la solubilidad de los principios activos si fuera menor la salinidad. Se intentó trabajar con diclofenaco sódico en pruebas preliminares y no se logro su solubilización en agua salada, pero si en agua dulce. Por lo tanto, no se utilizó como fármaco de experimentación.
Oxigenación del medio previo a eclosión de quistes	Si	Si	Si	Se oxigena para aumentar la eclosión. Así mismo, se asegura que la letalidad de los organismos será debido a las sustancias y no por falta de oxígeno.

Parámetro	A. salina	Artoxkit M	Thamno- toxkit F	Observaciones
Fuente de luz para eclosión de quistes	Incandente	Fluorescente (4000 lux) por 1 hora, luego oscuridad	Fluorescente (4000 lux)	La luz Incandescente da calor y la fluorescente no, pudiendo esto representar diferencias en la eclosión de los organismos. Se logra únicamente fotoestímulo con la fluorescente, exponiendo a los organismos a fotoestímulo y calor, que podría ser dañino y letal a los organismos y que evapora, por lo tanto, reduce el volumen del medio.
Temperatura de eclosión y de ensayo	No controlada	$25 \pm 1^\circ\text{C}$	$25 \pm 1^\circ\text{C}$	Se mantiene temperatura constante con los kits, incidiendo dicho control, diferencias en el % de eclosión de los organismos. En el método convencional no existe un control de temperatura. Por lo tanto, esta aumenta y disminuye, dependiendo del medio ambiente.
Tiempo que se espera para la eclosión de los quistes	48h	24h	18-22h	Se descartan los nauplios de la prueba convencional eclosionados las primeras 24h y se utilizan los que eclosionan en las siguientes 24 horas.
Volumen (mL) de muestra en cada pozo	0.4	1	1	Probablemente hay más oxígeno disuelto en las de mayor volumen.
Parámetro	A. salina	Artoxkit M	Thamno- toxkit F	Observaciones

Número de diluciones de muestra en cada placa para cada muestra	3	5	5	Probablemente hay más exactitud entre más concentraciones son evaluadas.
Placa multipozos usada	96 pozos	24 pozos	24 pozos	En los 3 métodos, cada dosis de extracto se evalúa por triplicado.
Número de organismos por pozo	Entre 10-15	10	10	Es probable que mientras más volumen de muestra se utilice y entre menor número de organismos existen, hay más oxígeno disponible
Número de organismos por ensayo	No controlado	30	30	30 individuos es un número estadísticamente confiable. En el método convencional no es controlado ya que en cada pozo pueden existir entre 10-15 nauplios , por lo tanto, el número total de organismos no es el mismo siempre
Duración del bioensayo	24h	48h	24h	Artoxkit dura 48 horas debido a que el fabricante lo recomienda desde hace algún tiempo. Determinaron que los controles pueden vivir 48 horas, y en este tiempo hay más oportunidad de observar efectos tóxicos, aumentado así la sensibilidad. De todas formas se hacen lecturas a las 24 horas.
Parámetro	A. salina	Artoxkit M	Thamno-toxkit F	Observaciones

Calculo de CL50, recomendado con cada bioensayo	Finney	EPA (método gráfico moving average, binomial, Probit)	EPA (método gráfico moving average, binomial, Probit)	Con <i>A. salina</i> convencional se utiliza sólo una prueba computarizada para calculo de CL50. En cambio, los kits utilizan 4 pruebas posibles para el calculo de CL50. Sin embargo, en este trabajo se usaron los métodos EPA para todos los bioensayos y la diferencia entre Finney y EPA fue mínima .
Dimensionales CL50	g/l	mg/l	mg/l	Se utiliza, en el método convencional, g/l. Sin embargo para la comparación se utilizó mg/l para todas las pruebas.
Método estandarizado y validado	Si	Si	Si	Los tres bioensayos son realizados con métodos estandarizados y validados.
Pasos para el ensayo	2	2	2	Se realiza un ensayo preliminar para determinar si existe o no actividad y luego se realiza el ensayo para determinar la CL50.
Ensayo para rango de acción (range finding)	Si, pero sin diluciones	Si, con diluciones	Si, con diluciones	El realizar ensayo de búsqueda de rango de acción con diluciones disminuye el trabajo posterior y limita a un rango de donde se encontrará la CL50. Efectuar pruebas con un rango menor de concentraciones da como resultado un intervalo de confianza más estrecho y un resultado más confiable.
Parámetro	A. salina	Artoxkit M	Thamno-toxkit F	Observaciones

Control de cada paso	Poco	Mucho	Mucho	En los ensayos con los kits se controla rigurosamente cada etapa de los bioensayos para asegurar resultados más confiables.
Procedimientos Estándar de Operación	Si	Si	Si	Los Procedimientos Estándar de los kits publicados en su manual de utilización y los PEOs de <i>A. salina</i> convencional en el Manual de Procedimientos del Proyecto de Biodiversidad Tropical Centroamericana-OEA(3, 4, 5).

10. CONCLUSIONES

1. *T. platyurus* es más sensible que *A. salina* del Artoxkit y que *A. salina* convencional para el tamizaje de plantas con actividad biológica, pudiendo ser el *T. platyurus* un organismo con el que se pueden obtener resultados que no se pueden obtener con *A. salina*, en la búsqueda de componentes de plantas con actividad biológica.
2. El medio de agua dulce permite mayor solubilidad de los principios activos de las plantas y los fármacos, que el medio salino.
3. El uso de quistes de *A. salina* y *T. platyurus* (kits) producidos bajo control de calidad y específicamente para ensayos de letalidad, asimismo ensayos de condiciones controladas (oxigenación, luz, temperatura, número de organismos) conlleva a mejores resultados.
4. La realización de un ensayo preliminar, “rango de actividad”, orienta para la realización de la prueba definitiva.

11. RECOMENDACIONES

1. Efectuar estudios más extensos con *T. platyurus* y *A. salina*, con un mayor número de extractos vegetales.
2. Considerar al *T. platyurus* como un organismo sustituto de *A. salina* cuando éste sea producido en cantidades tan grandes como *A. salina*.
3. Experimentar en menores concentraciones de agua salada ya que la *A. salina* tolera un rango amplio de salinidad.
4. Establecer cambios en el ensayo de *A. salina* convencional como: número de organismos por pozo, control de luz y temperatura en la eclosión de quistes, mayor control en la edad de organismos utilizados en los ensayos.

12. REFERENCIAS

- (1) Sam, T.W. 1993. Toxicity testing using the brine shrimp: *A. salina* in bioactive natural products. Detection, isolation and structural determination. Colegate, S.M. and R.J. Moluneux . CRC Press, Boca Raton. pp: 442-454.
- (2) Persoone, G.; Claus , C. & Jaspers, E. (Eds). 2000. New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring. Plenum Publishers, New York. 550p.
- (3) Artoxkit M. 1990. *Artemia* toxicity screening test for estuarine and marine waters. Standard Operational Procedure. Creasel, Deinze, Belgium. 22 p.
- (4)Thamnotoxkit F. 1995. Crustacean toxicity screening test for freshwater. Standard Operational Procedure. Creasel, Deinze, Belgium. 23 p.
- (5) Cáceres, A. 1999. Manual de procedimientos del proyecto biodiversidad tropical centroamericana. OEA. pp:9-12.
- (6)Michael, A; Thompson, CG & Abramovitz M. 1956. *A. salina* as a test organism for bioassay. Science 123:464.
- (7) Barnes, R.D. 1984. Zoología de los invertebrados. 4 Ed. Interamericana, México, D.F. 1157 p.
- (8) Robinson, A. 1965. Anesthesia of *Artemia* larvae: Method for quantitative study. Science 149: 1255-1258.
- (9) Blizzard, T.A. 1988. Brine Shrimp (*A. salina*) as a convenient bioassay for avermectin analogs. pp 1304- 1307.

- (10) Solís, P.N. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Médica* 59:250-252
- (11) Zani, C.L., *et al.* 1995. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Phytomedicine* 2(1): 47-50.
- (12) Meyer BN, Ferrigni NR & Putnam JI. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45:31-34
- (13) Beloz, A. 1992. Brine shrimp bioassay screening of 2 medicinal plants used by the Warao: *Solanum straminifolium* and *Virola suichnamensis*.. *Journal of Ethnopharmacology* 37:225-227
- (14) Awachie, P.I.A & Ugwu, F.O. 1997. Preliminary Investigation of the Antimicrobial and Brine Shrimp Lethality Properties of Some Nigerian Medicinal Plants. *International Journal of Pharmacognosy* 35:338-343
- (15) Chavez, P.I. *et.al.* 1997. Citotoxicity Correlations of Puerto Rican Plants Using a Simplified Brine Shrimp Lethality Screening Procedure 35:225-226
- (16) Cáceres, A. *et al.*. 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *J. Ethnopharmacology* 62:195-202.
- (17) Adoum, O.A. ; Dabo, N.T.& Fatope, M.C. 1997. Bioactivities of Some Savanna Plants in the Brine Shrimp Lethality Test and in vitro Antimicrobial assay 35:334-337.

- (18) Berger, I. *et.al.* 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology* 62: 107-115.
- (19) Persoone, G. & Castristi-Catharos, J. 1989. A simple bioassay with *Artemia salina* to determine the acute toxicity of antifouling paints 23: 893 – 897.
- (20) Ojala, T. *et.al.* 1999. Bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins. *Planta Médica*. pp:715-718.
- (21) Kiviranta, J. Sinonen, K. & Niemela, S.I. 1991. Detection of Toxicity of Cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environmental Toxicology & Water Quality*. 6: 423 –436.
- (22) Juárez, S. 1996. Determinación de actividad tóxica *in vitro* de plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (tesis de graduación: Química Bióloga). 99 p.
- (23) Cruz, S. 2000. Fraccionamiento bioguiado y tamizaje fitoquímico del extracto etanólico con actividad anti- *Artemia* de *Ocimum micranthum* Willd. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (tesis de graduación: Química Farmacéutica). pp: 1-25.
- (24) Cáceres, A. *et.al.* 2002. Detección de la biodiversidad vegetal de Guatemala y determinación de su actividad biocida. *Memorias – XI Congreso Italo – Latinoamericano de Etnomedicina “Alberto Di Capua”*. Roma, Italia. pp: PL11

- (25) Cáceres, A. *et.al.* 2002. Actividad Biocida de Plantas Detectadas por Etnobotánica y Bioprospección en la Reserva de Biosfera Sierra de las Minas. Reporte OEA.
- (26) USEPA1985.Methods for Measuring the Acute Toxicity of effluents to fresh water and marine organisms. 3rd Ed. TOXDAT. Multimethod Program. EPA/600/4-85/013
- (27) Purves, W. 1998. Life: The science of biology. 5 Ed.. Sinauer Associates Inc, Massachussets. 1243p.
- (28) Caceres, A. 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria . Guatemala.
- (29) Franssen, F. *et.al.* 1997. *In vivo* and *in vitro* Antiplasmodial Activities of Some Plants Traditionally Used in Guatemala against Malaria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy :1500-1503
- (30) Francois, G. *et.al.* 1996. Antiplasmodial Activities and Cytotoxic Effects of Aqueous Extracts and Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena lobata*. Planta Medica Vol. 62. New York. pp:126-129.
- (31) Niembro, A. 1986. Arboles y arbustos útiles de México. Limusa, México D.F. pp: 206.
- (32) Cáceres, A., Martínez, J.& Bernal, H. Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas. CYTED, Colombia, Bogotá. pp: 388-399, 434-438.

- (33) Standley, P.C. & Williams, L.O. 1970. Flora of Guatemala. Chicago, Field Museum of Natural History. V.24, part IX, Nos. 2 y 4 pp: 382-383, 464
- (34) Cáceres, A. Comunicación Personal. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Biológica. Departamento de Citohistología.
- (35) Katzung, B. 1999. Farmacología Básica y Clínica. 7^a Ed. Manual Moderno, México. pp: 433, 564, 671, 687, 859.
- (36) PLM. 1988. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 19^a Ed. Ed. Panamericana. Centro América - Dominicana. pp:958.

13. ANEXO

13.1 Generalidades de los Organismos de Ensayo

Los organismos que se utilizaron, *Artemia salina* y *Thamnocephalus platyurus*, son crustáceos de la **Clase Branchiopoda**. Los branquiópodos son pequeños y mayormente habitan en agua dulce. Se denominan branquiópodos pues tienen apéndices corporales que son “pies de branquias”. Estos actúan, además de ser órganos de intercambio gaseoso, como filtros de alimento y sirven para su locomoción. Esta Clase está compuesta por varios grupos u ordenes: Anostraca, Notostraca y Diplostraca (compuesto por los subórdenes Conchostraca y Cladocera). La mayor parte de los branquiópodos tienen unos pocos milímetros de longitud y algunos son tan pequeños que no pasan de los 0.25 mm. Los más grandes son los anostráceos, que pueden alcanzar hasta 10 cm. Casi todos los branquiópodos son pálidos o transparentes, pero a veces se observa color rosado o rojo por la presencia de hemoglobina cuando hay poco oxígeno disuelto en su hábitat. Algunos cladóceros y conostráceos son pardos o negros (7).

Los branquiópodos viven casi sólo en agua dulce, excepto algunos cladóceros que son marinos. Sin embargo, sólo los cladóceros habitan arroyos, lagos y lagunas. Los otros grupos están restringidos a charcas temporales, manantiales y pequeñas lagunas. La única excepción es el camarón de agua salobre *Artemia*, un anostraco que se encuentra en lagos de aguas saladas en todo el mundo (7).

La partenogénesis es frecuente en los branquiópodos y en algunas especies los machos son raros o inexistentes. En los cladóceros, los huevos partenogenéticos eclosionan en el interior de las hembras por varias generaciones, hasta que ciertos factores (cambios de temperatura o menos disponibilidad alimenticia por aumentos de población) inducen la aparición de machos, dándose lugar a la fecundación de huevos. Las paredes de la cámara de

incubación [de los huevos] se transforman en una cámara protectora en forma de silla de montar (efipio). Los efipios flotan, se hunden hasta el fondo o se adhieren a objetos y son capaces de tolerar la desecación, el congelamiento e incluso el paso a través del tracto digestivo de peces o aves y mamíferos piscívoros. Por medio de estos huevos latentes protegidos, los cladóceros pueden dispersarse por acción del viento, por diversos animales o sobrevivir durante las sequías estivales (7).

La producción de huevos latentes puede verse estimulada por factores externos como la densidad de población, temperatura y fotoperíodos. La latencia (o diapausia) puede ocurrir después de un periodo inicial de desarrollo [del embrión], por lo que los huevos pueden estar listos para eclosionar rápidamente cuando se presenten condiciones favorables. Factores que interrumpen la latencia son: oxígeno, salinidad, temperatura e iluminación (7).

13.1.1 *Artemia salina*

A. salina es un crustáceo del orden Anostraca. Se encuentra en cuerpos de agua desde salobre hasta ultrasalino. Esta alta tolerancia a un amplio rango de salinidad lo hace un organismo fácil de estudiar. Produce, bajo ciertas condiciones ambientales, huevos durmientes (quistes) que pueden almacenarse en condiciones secas por largo tiempo, sin perder su viabilidad. Al sumergirse en agua de mar, larvas (instar I) de nado libre eclosionan de los quistes en aproximadamente 24 horas (7).

El primer reporte del uso de *A. salina* como un organismo de ensayo apareció en 1956. Desde entonces han habido muchos reportes acerca de uso para estudios ambientales, tamizaje de toxinas naturales y como tamizaje general para sustancias bioactivas de extractos vegetales (1,6).

A. salina tiene varias ventajas al ser utilizada como bioensayo, como por ejemplo : a) los quistes son viables por varios años b) posee una alta sensibilidad a tóxicos c) se utiliza un volumen pequeño de muestra al realizar los ensayos d) requiere de instrumentación poco compleja e) es posible la miniaturización f) bioensayo rápido, simple y económico(1, 7).

La disponibilidad permanente de quistes de este organismo, que se usa extensamente en acuicultura para la producción de alimento vivo para larvas de crustáceos y peces, es hasta la fecha una gran ventaja para el uso rutinario de esta especie en toxicología acuática. El uso de quistes como material biológico inicial resuelve uno de los principales problemas biológicos, tecnológicos y financieros de la toxicología rutinaria. Esto es, que evita la necesidad de cultivar y mantener continuamente “stock” vivo de estos organismos, en estado saludable y en números suficientes. Además, el hecho que todos los investigadores puedan obtener y usar quistes estándar (de referencia) puede contribuir significativamente a la estandarización de los métodos de bioensayos y la repetibilidad de los resultados (2,3).

Las ventajas de *A. salina* como organismo de prueba, gradualmente condujeron al aumento en la utilización de esta especie en investigaciones fundamentales y aplicadas de ecotoxicología. Actualmente, *Artemia* se utiliza como especie de bioensayo para una variedad de objetivos tales como: investigación de la fuente de toxicidad en mezclas de sustancias químicas y muestras ambientales, tamizaje de toxicidad aguda de sustancias químicas, detección de toxinas naturales en comestibles y farmacéuticos, estudios de modelos de acción tóxica de sustancias, y estudios de la transferencia trófica de contaminantes. *Artemia* ha probado ser un organismo versátil y valioso en pruebas de toxicidad con un sólo organismo, particularmente si es estudiado con otras especies endémicas (3, 27, 28).

El potencial de *Artemia* para investigación y aplicaciones en toxicología acuática se ha explorado desde 1975 en el Laboratorio de Investigación Biológica en Toxicología Acuática de la Universidad Estatal de Ghent, Bélgica. En 1981 se desarrolló el primer ensayo estandarizado de ecotoxicología marina: el ensayo ARC, que es un ensayo de 24 horas para determinar la concentración letal media (CL₅₀) en nauplios de instares II y III. La confiabilidad y precisión de este ensayo fue investigada durante un extenso ejercicio de calibración involucrando a 80 laboratorios americanos y europeos, dando resultados muy satisfactorios (29).

Un ejemplo específico de una aplicación de esta especie en farmacología es la prueba de letalidad para el pretamizaje de extractos de especies vegetales medicinales contra *Trypanosoma cruzi* (11, 12).

13.1.2 *Thamnocephalus platyurus*:

T. platyurus es también un crustáceo del orden Anostraca y al igual que *A. salina* produce quistes, en una etapa de su ciclo de vida. Es un habitante típico de ambientes acuáticos temporales libres de depredadores que se secan periódicamente o muestran cambios bruscos en el nivel de agua. Tienen una distribución geográfica muy amplia, desde el ártico o regiones altas, hasta estanques creados por la lluvia en áreas subtropicales. Sin embargo, éstos ocurren principalmente en áreas localizadas y, a menudo, remotas (4).

13.2 Extractos Vegetales

13.2.1 *Solanum americanum*

13.2.1.1 Descripción Botánica

El *Solanum americanum* (quilete) es una hierba de 1m de alto, tallo pubescente. Hojas en pares o solitaria, 3-14cm de largo, lanceoladas, ápice agudo. Inflorescencia internodal, racemiforme, pedunculada, pocas flores (28).

13.2.1.2 Usos Medicinales Atribuidos

El cocimiento de hojas y semillas tiene amplio uso medicinal, por vía oral se administra en el tratamiento de afecciones gastrointestinales (cólico, diarrea, estreñimiento, gastritis, úlcera gástrica) y respiratorias (asma, amigdalitis, tos ferina), anemia, cirrosis, dolor de muela, presión alta, reumatismo. La decocción de hojas se usa por vía tópica para el tratamiento de afecciones dermatomucosas. Se le atribuye propiedad aperitiva, calmante, depurativa, diurética, desinflamante, emoliente, febrífuga, mineralizante, reconstituyente, sedante y vulneraria (28).

13.2.1.3 Farmacología

Estudios antibacterianos demuestran que la decocción de hojas tiene actividad antibiótica, siendo el mejor disolvente para la extracción de la actividad antibiótica el etanol. La infusión de hojas no tiene actividad hipoglicémica en un modelo en rata. Posee actividad espasmolítica, frente a la acetilcolina y frente a cloruro de bario, de donde se deduce que inhibe el espasmo por mecanismos muscarínicos y musculotrópicos (28).

Estudios de citotoxicidad muestran que el extracto presenta actividad hemolítica aún en altas diluciones; en las concentraciones terapéuticas no presenta citotoxicidad hacia células de fibroblastoma. Los principios tóxicos se atribuyen a solanina y solanidina (28).

13.2.2 *Gliricidia sepium*

13.2.2.1 Descripción Botánica

Gliricidia sepium (madrecacao) es un árbol de 10m de alto, copa extendida o piramidal, tronco de 30cm de diámetro, corteza café oscuro; ramas puberulentas de jóvenes, luego glabras. Hojas deciduas, lanceoladas, 3-7cm de largo, pinnadas, 2-15 foliolos, verde en la parte superior y manchas púrpura en la inferior, muy aromáticas. Flores en racimos, 5-10cm de largo, densamente floreados; cáliz puberulento o glabro (28).

13.2.2.2 Usos Medicinales Atribuidos

El cocimiento de las hojas y corteza se administran por vía oral para tratar afecciones gastrointestinales (diarrea, dolor de estómago, tifoidea), respiratorias (resfriados, fiebre, flemas) y de la piel (erupciones, impétigo, gangrena, granos jote, gonorreas, quemaduras, picaduras de insectos, úlceras), paludismo y paperas. Tópicamente las hojas y corteza, frescas o cocidas, se aplican como lavados, compresas, emplastos o sobados en muchas afecciones de la piel (28).

Se le atribuye propiedad antihistamínica, antimalárica, antiséptica, antifúngica, cicatrizante, diurética, expectorante, febrífuga, hipotensora, insecticida y rodenticida (28).

13.2.2.3 Farmacología

Estudios demuestran que la tintura de las hojas es activa contra *N. gonorrhoea* con un espectro de inhibición de 80% de cepas patógenas. La decocción de hojas es activa contra *M. canis* y *T. mentagrophytes*, tiene una CIM de 100-200 mg/ml y presenta actividad fungicida y fungistática. Los órganos con mayor actividad son la corteza, flores y raíz; el mejor disolvente es el etanol (28).

13.2.3 *Neurolaena lobata*

13.2.3.1 Descripción Botánica

Neurolaena lobata (tres puntas) es una hierba erecta, 1- 4 m de alto, poco ramificada; tallos estriados, sulcados, pubescentes. Hojas cortopetioladas o sésiles, glabras, alternas, acuminadas o agudas a la base, 5- 30 cm de largo, dentadas escabrosas- hirsutulosas en el haz (28).

13.2.3.2 Usos Medicinales

La infusión amarga de hojas es administrada por vía oral para el tratamiento de afecciones gastrointestinales (diarrea, cólico), diabetes, malaria y otros procesos febriles, gonorrea e inflamaciones (28).

Las hojas frescas machacadas se aplican tópicamente en picazones; el jugo es sobado en la piel como repelente de garrapatas; la infusión se aplica para sanar diversos tipos de heridas, lesiones y úlceras (28).

Se le atribuye propiedad antibiótica, antimalárica, aperitiva, carminativa, diurética, espasmolítica, febrífuga, hipoglicémica, hipotensora y tónica (28).

13.2.3.3 Farmacología

Estudios antimicrobianos demuestran que la tintura de hojas es activa contra bacterias y hongos levaduriformes. Los extractos alcohólicos son activos contra epimastigotes *in vitro*, contra tripomastigotes *in vitro* e *in vivo* de *T. cruzi* y producen una disminución estadísticamente significativa en los niveles de azúcar en el ratón. Los extractos acuosos presentan toxicidad contra *A. salina*, no así los de diclorometano, y poseen ambas actividades antimalárica debido principalmente a sus sesquiterpenlactonas (28,29,30).

13.2.4 *Petiveria aliaceae*

13.2.4.1 Descripción Botánica

Petiveria aliaceae (apacín) es una hierba perenne con tallo erecto, hasta de 1m de alto, a menudo leñoso, raíz profunda, fuertemente olorosa; ramas jóvenes puberulentas o glabras. Hojas de pecíolo de 1- 5 cm de largo, limbo oblongo u obovalado, 5-15cm de largo, verde brillantes. Inflorescencias en racimos delgados, 10-35mm de largo, poco floreadas; flores subsésiles o en cortos

pedicelos, sépalos blanco- verduzcos, oblongo- lineares, 3- 4mm de largo. Frutos comprimidos en el raquis, angostamente cuneados de 8mm de largo (28).

13.2.4.2 Usos Medicinales

El cocimiento de hojas se usa para tratar afecciones gastrointestinales (diarrea, disentería, flatulencia), respiratorias (amigdalitis, asma, bronquitis, catarro, tos ferina), nerviosas (calambres, epilepsia, histeria, rabia), dolor de cabeza y de muelas, caries, reumatismo y diabetes (28).

El cocimiento de la raíz administrado por vía oral se usa para tratar asma, catarro, cistitis, dismenorrea, enfermedades venéreas, fiebre, inflamación, histeria y neumopatía; por vía tópica se aplica en compresas y cataplasmas para tratar diversas afecciones de la piel (28).

13.2.4.3 Farmacología

Estudios antibacterianos demuestran que la tintura de hojas es inactiva contra bacterias causales de infecciones dermatomucosas, del tracto digestivo y de las vías respiratorias. La materia activa medicinalmente son hojas y raíces secas (28).

13.2.5 *Ocimum micranthum*

13.2.5.1 Descripción Botánica

Ocimum micranthum (albahaca) es una hierba anual de 50cm de alto, fuertemente olorosa, erecta, ramificada. Hojas opuestas, delgadas, ampliamente ovaladas, de 2-7cm de largo. Inflorescencia con numerosos verticilos florales, separados, en alargada panícula racimosa, pedicelos de 4-7mm de largo (28).

13.2.5.2 Usos Medicinales

El cocimiento o infusión se usan oralmente para tratar afecciones gastrointestinales (diarrea, disentería, gastralgia, parasitismo), respiratorias (bronquitis, catarro, fiebre, resfrío, tos) y nerviosas, dolor de oído y cabeza. Tópicamente se usan en baños para tratar afecciones dérmicas (28).

Se le atribuye propiedad antiséptica, aromática, astringente, calmante, carminativa, colagoga, diurética, emenagoga, espasmolítica, estornutatoria, febrífuga, galactogoga, rubefaciente, sudorífica y vermífuga (28).

13.2.6 *Curatella americana*

13.2.6.1 Descripción Botánica

Curatella americana (lengua de vaca, raspa guacal) es un árbol de 5 a 9 m de alto y de hasta 25 cm de diámetro, con tronco no recto y copa muy irregular, ramificado frecuentemente desde la base con pocas y gruesas ramas; perennifolio; corteza externa fisurada, internamente rosada, que cambia a parda rojiza. Inflorescencias paniculadas y axilares con pétalos blancos, reflexos (están hacia abajo) y estambres numerosos. Florece a principios de la estación seca, las flores emanan un olor dulce. Maduran de septiembre a marzo (31).

13.2.6.2 Usos

Las semillas se utilizan localmente para saborizar el chocolate. La madera de la *Curatella americana* es dura y resistente y localmente se utiliza para leña y carbón. Tiene usos en construcción para postes y construcciones pequeñas, asimismo las hojas contienen grandes cantidades de sílice y en algunos lugares se emplean como sustituto del papel lija para pulir madera y limpiar utensilios de cocina, loza y herramientas. Medicinalmente se utiliza la infusión que se obtiene del cocimiento de las hojas en algunas regiones para lavar heridas y contra erupciones de la piel (31,32).

13.2.7 *Prunus barbata*

13.2.7.1 Descripción Botánica

Prunus barbata es un árbol de 7 a 11 m de alto, completamente glabro; hojas oblongas u oblongas – lanceoladas de 5 - 10cm de largo y 2 -3.5cm de ancho (33).

Prunus barbata aun es una planta en bioprospección. Actualmente se le realizan estudios etnobotánicos, tamizaje con bioensayos micrométricos, estudios de fraccionamiento bioguiado y evaluación preclínica por lo tanto no existe mucha información sobre ella (34).

13.2.8 Quercus crispifolia

13.2.8.1 Descripción Botánica

Quercus crispifolia (encino, roble) es un árbol, glabro de un tono grisáceo o rojizo, con frutos bienales (33).

Quercus crispifolia se localiza en Guatemala usualmente en Alta Verapaz, Chiquimula, Jalapa y San Marcos y aún es una planta en etapa de bioprospección. Actualmente se le realizan estudios etnobotánicos, tamizaje con bioensayos micrométricos, estudios de fraccionamiento bioguiado y evaluación preclínica por lo que no existe mucha información sobre ella (34).

13.2.9 Rhizophora mangle

13.2.9.1 Descripción Botánica

Rhizophora mangle (mangle) es una árbol con la corteza astringente, que alcanza una altura de 10m o más. Forma por lo general matorrales densos casi impenetrables por medio de las radículas del embrión grandemente alargadas y las numerosas raíces adventicias que partiendo de las ramas superiores le sirven al árbol de puntales y sostén en el medio cenagoso que habita (32).

13.2.9.2 Usos Medicinales

Es empleado con éxito en las enfermedades de las vías biliares, tales como angiocolitis y colecistitis, haciendo desaparecer la ictericia, el estreñimiento y la falta de apetito, común en esas afecciones. Es útil en la disentería microbiana y amebiana, por la acción antiséptica y astringente, pues con su uso disminuyen los pujos o tenesmo y las hemorragias intestinales (32).

13.2.10 *Smilax domingensis*

13.2.10.1 Descripción Botánica

Smilax domingensis (zarzaparilla) es una planta glabra completamente y perenne. Tallos teretes, escasamente armados en la parte inferior con agujones robustos recurvados e inermes en la parte superior. Hojas de 6-15 x 1.5-10cm, 4-6 veces más largas que anchas, ovadas, lanceolado-ovadas, o lanceoladas, cartáceas, inermes, 5-nervias desde la base, las nervaduras primarias prominentes en el envés, no impresas en el haz, el par exterior submarginal, las nervaduras secundarias conspicuas, algo prominentes, reticuladas, el ápice brevemente acuminado o brevicuspidado, la base aguda, el margen entero (32).

13.2.10.2 Usos Medicinales

A *Smilax domingensis* se le atribuyen las siguientes propiedades: antiinflamatoria, antifúngica, antiprurítica, antirreumática, antiséptica, cicatrizante, desinflamante, estimulante, diurética, diaforética, depurativa, sudorífica y tónica (32).

13.3 Fármacos

13.3.1 Acetaminofén

El acetaminofén es el metabolito activo de la fenacetina, que causa el efecto analgésico de ésta. Es un inhibidor débil de las prostaglandinas en los tejidos periféricos, y no posee efectos antiinflamatorios importantes (35).

El acetaminofén se fija levemente a las proteínas plasmáticas, y en parte se metaboliza por las enzimas microsómicas hepáticas y se transforma en sulfato de acetaminofén y glucurónido, que son farmacológicamente inactivos (35).

13.3.2 Furosemida

Los diuréticos del asa, como la furosemida, inhiben selectivamente la resorción de NaCl en la rama ascendente gruesa de la asa de Henle. La furosemida inhibe el sistema de transporte acoplado $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ en la membrana luminal ascendente gruesa del asa de Henle. Al inhibir este transportador, los diuréticos del asa reducen la resorción del NaCl y también disminuye el potencial positivo normal de la luz que deriva de la recirculación de K^+ . Este potencial eléctrico normalmente impulsa la resorción de cationes divalente en el asa. Los diuréticos del asa, al abolir el potencial positivo de la luz causan un incremento en la excreción de Mg^{+2} y Ca^{+2} . El uso prolongado puede provocar hipomagnesemia, significativa en algunos pacientes. Como el Ca^{+2} se resorbe en forma activa en el túbulo contorneado distal, los diuréticos del asa no suelen causar hipocalcemia. Sin embargo, en trastornos que producen hipercalcemia, la excreción de Ca^{+2} puede aumentarse considerablemente combinando agentes del asa con infusiones salinas (35).

Además de su actividad diurética, los agentes del asa parecen tener efectos directos sobre el flujo sanguíneo a través de varios lechos vasculares. Los mecanismos de estas acciones no están bien definidos. La furosemida aumenta el flujo sanguíneo renal y causa la redistribución del riego sanguíneo dentro de la corteza del riñón (35).

13.3.3 Amoxicilina

La amoxicilina, químicamente p-hidroxiampicilina, tiene un espectro antibacteriano similar al de la ampicilina. Como la ampicilina es destruida por las betalactamasas, no puede ser utilizada para tratar infecciones causadas por

cepas resistentes de bacterias del tipo productor de betalactamasa. Sin embargo, la amoxicilina es más estable en ácido que la ampicilina y su absorción no es afectada de manera apreciable por los alimentos; no puede ser administrada por vía parenteral. La amoxicilina es la droga de elección para las infecciones causadas por *S. faecalis*, *B. catarrhalis* o *B. fragilis* (infecciones leves a moderadas) y una droga alternativa para las infecciones por *Staphylococcus* productor de penicilinas (combinada con clavulanato), *N. gonorrhoeae* (con probenecid), *E. coli* (con clavulanato). Una dosis oral de 250 mg brinda una concentración plasmática máxima de alrededor de 4 ug/ml En el plasma está unida a las proteínas en un 17%. El volumen de distribución es de 0.31ml/g. Del 50 al 72 % se elimina por secreción tubular renal. La vida media es de alrededor de 1 hora cuando la función renal es normal y de 8 a 16 horas en la insuficiencia renal (35).

La amoxicilina interfiere con la síntesis de la pared celular de la célula bacteriana durante su división, causando la muerte de la misma y dando como resultado la actividad antibacteriana (35).

13.3.1 Cefalexina

La cefalexina es una cefalosporina de primera generación. Estos antibióticos son muy activos contra cocos grampositivos, incluyendo neumococo, estreptococo y estafilococo pero no son activos contra cepas de estafilococos resistente a meticilina. *Escherichia coli*, *Kebsiella pneumonia* y *Proteus mirabilis* son a menudo susceptibles (35).

La cefalexina se absorbe del intestino, en una extensión variable, después de una dosis oral de 500 mg. La excreción es principalmente por secreción tubular y por filtración glomerular en la orina (35).

Su mecanismo de acción es inhibición de la síntesis de la pared bacteriana de manera semejante a la penicilina (35).

13.3.5 Secnidazol

El secnidazol o α - 2,dimetil-5-nitro-1-H-imidazol-1-etanol previa reducción del grupo nitro de su estructura molecular, interfiere en la síntesis del DNA, con la inhibición consecuente de su función. Es un fármaco de elección en el tratamiento de amebiasis intestinal aguda crónica o de un portador asintomático (36).

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE 10 EXTRACTOS VEGETALES Y 5 FARMACOS UTILIZANDO 3 BIOENSAYOS TOXICOLÓGICOS

1. RESUMEN

Los productos fitofarmacéuticos pueden igualar a los mejores fármacos y la apropiada extracción de los productos vegetales es una fuente potencial de medicamentos a la cual se le evalúa para evidenciar farmacológicamente los componentes biológicos.

El trabajo de investigación se realizó con el propósito de comparar y mejorar el pretamizaje de plantas con posible actividad biológica (comparando sensibilidad) y obtener resultados confiables y significativos en la búsqueda de componentes de plantas con dicha actividad. Las técnicas de pretamizaje comparadas fueron *Artemia salina* convencional (metodología descrita por Solis, 1993), *Artemia salina* (ARTOXKIT) y *Thamnocephalus platyurus* (THAMNOTOXKIT). Dichas técnicas de pretamizaje pretenden orientar al farmacólogo, al químico y al farmacognosista hacia la utilización de métodos relativamente sencillos, que no involucren animales, que tengan bajo costo y que pueda realizarse un número grande de muestras en forma rápida, sencilla y reproducible.

Se comparó la susceptibilidad de las técnicas anteriormente mencionadas a 10 extractos vegetales: 5 con actividad anti-*Artemia* conocida (hoja de *Solanum americanum*, *Gliciridia sepium*, *Neurolaena lobata*, *Petiveria alliaceae*, *Ocimum micranthum*), 5 sin actividad anti-*Artemia* (*Curatella americana*, *Prunus barbata*, *Quercus crispifolia*, *Rhizophora mangle*, *Smilax domingensis*), y 5 fármacos (acetaminofén, secnidazol, cefalexina, amoxicilina y furosemida). Los tres organismos fueron susceptibles a la furosemida, acetaminofén, *P. alliaceae* y *O. micranthum*; no así a *C. americana*, amoxicilina, cefalexina y el secnidazol. La *A. salina* (Artoxkit) fue más susceptible a *O. micranthum* y furosemida y no presentó letalidad por *R. mangle*, *P. barbata*, *Q. crispifolia* ni *S. domingensis*. La *A. salina* convencional solamente presentó letalidad a *P. alliaceae*, *O. micranthum*, furosemida y acetaminofén. *T. platyurus* fue el más susceptible a *S. americanum*, *P. alliaceae*, *N. lobata*, *G. sepium* y acetaminofén.

Con base al análisis estadístico se concluyó que el bioensayo con *T. platyurus* es en general más susceptible que *A. salina* para realizar tamizaje de extractos de plantas.

2. INTRODUCCION

El estudio de compuestos bioactivos provenientes de plantas se ve muchas veces limitado por la falta de procedimientos de tamizaje apropiados, simples y rápidos. Uno de los efectos que se observan al monitorear actividad biológica de productos fitofarmacéuticos es la letalidad, ya que la evaluación de la respuesta es simple: sobreviven o mueren. Un procedimiento para tamizaje de toxicidad no debería de requerir de mucha especialización del personal técnico y es esencial como una etapa preliminar en el estudio de compuestos bioactivos. Un organismo experimental simple que se ha utilizado ampliamente para este

propósito es el camarón salino del Orden Crustacea, de la clase Anacostraca, *Artemia salina* (*A. salina*) (1).

En Guatemala se ha utilizado el método convencional de *A. salina* (microtécnica descrita por Solis, 1993) para detectar la citotoxicidad de extractos vegetales y fármacos. Sin embargo, ha surgido interés en diversas instituciones por buscar otras opciones disponibles a nivel mundial que involucren otro tipo de métodos con otros organismos. Entre ellas se puede mencionar una que utiliza *A. salina* (ARTOXKIT M) producida específicamente para su uso en microbioensayos de toxicidad, así como otro que utiliza *Thamnocephalus platyurus* (*T. platyurus*) (THAMNOTOXKIT F). Este último bioensayo es especialmente atractivo, por haberse encontrado en varios estudios, ser más susceptible que *A. salina*, además de no utilizar agua salada para la prueba (2).

En el presente estudio se hizo una comparación paralela de tres bioensayos para determinar la actividad biológica de extractos vegetales y fármacos. Los bioensayos que se efectuaron fueron: *A. salina* método "convencional", (Solis, 1993). *A. salina*, un kit comercial (ARTOXKIT M) Y *T. platyurus*, un kit comercial (THAMNOTOXKIT F).

Para dicha comparación se utilizaron diez extractos de plantas y cinco fármacos:

1. Cinco extractos de plantas con actividad citotóxica y anti-*Artemia* conocida: hoja de *S. americanum* (quilete), corteza de *G. sepium* (madrecacao), hoja de *N. lobata* (tres puntas), raíz de *P. alliaceae* (apacín), aceite de *O. micranthum* (albahaca).
2. Cinco extractos de plantas sin actividad citotóxica, ni anti-*Artemia* conocida: hoja de *C. americana* (lengua de vaca), hoja de *P. barbata*, hoja de *Q. crispifolia* (encino), corteza de *R. mangle* (mangle), rizoma de *S. domingensis*.
3. Cinco fármacos: acetaminofén, secnidazol, cefalexina, amoxicilina y furosemida que se conoce poseen actividad biológica, por lo tanto son citotóxicos para *A. salina*.

Con cada sustancia se corrieron los tres bioensayos y luego se compararon las concentraciones letales medias obtenidas (CL50) con cada uno. Se determino, así mismo, cuál es el organismo más sensible a estas sustancias probadas y las diferencias entre los bioensayos. Los ensayos se realizaron de acuerdo a los procedimientos estándar de operación propios de cada método (3, 4, 5).

3. MATERIALES Y METODOS

3. Universo de trabajo

3..1 Universo de Estudio

El universo fue constituido por extractos vegetales con actividad anti-*Artemia*, extractos vegetales sin actividad anti-*Artemia* y fármacos con actividad citotóxica conocida. Se utilizaron quistes de *A. salina* de venta comercial y kits de *A. salina* y *T. platyurus* (ARTOXKIT M Y THAMNOTOXKIT F)

3.1.2 Muestra

La muestra fue constituida por extractos etanólicos de: *S. americanum* (hoja), *G. sepium* (corteza), *N. lobata* (hoja), *P. alliaceae* (raíz), *C. americana* (hoja), *P. barbata* (hoja), *Q. crispifolia* (hoja), *R. mangle* (corteza), *S.*

domingensis (rizoma) y *O. micranthum* (aceite). Así mismo se utilizaron los fármacos acetaminofén, secnidazol, cefalexina, furosemida y amoxicilina.

3.2 Recursos

3.2.1 Humanos

- Tesista: Br. Karen Rebeca Pérez
- Asesores: Lic. Pablo Mayorga
Dra. Ana Lucía Valle

3.3 Método

Se utilizaron tres metodologías de bioensayos de letalidad

3.3.1 Procedimientos Estándar de Operación ARTOXKIT M y THAMNOTOXKIT F (3,4)*

Los procedimientos estándar de operación de ambas metodologías son similares y difieren únicamente en algunos puntos. Estas diferencias se indicaran explícitamente.

3.3.1.1 Preparación del Agua de Dilución y Eclosión de los Quistes: Día 0

3.3.1.1.1 Preparación del Agua de Mar Estándar para ARTOXKIT M

Los viales con sal y soluciones concentradas de sales provistos en el kit, permiten la preparación de 1 lt de agua de mar estándar (artificial) con una salinidad normal de agua de mar (26g/L). La solución estándar de agua de mar fue utilizada para medio de eclosión de los quistes y como medio de dilución para la serie de dilución de las sustancias experimentales.

La solución de un litro del agua de mar estándar se almacenó en la refrigeradora (en oscuridad). Se tuvo cuidado que el medio refrigerado alcanzara la temperatura ambiente antes de utilizarlo.

3.3.1.1.2 Preparación del Agua Dulce para THAMNOTOXKIT F

Los viales con soluciones concentradas de sales, similares a las utilizadas para preparar ARTOXKIT M, sin la utilización de cloruro de sodio, cloruro de magnesio ni ácido bórico, permitieron la preparación de 1lt

de agua dulce estándar (artificial). La solución estándar de agua, fue utilizada como medio de eclosión de los quistes y como medio de dilución para la serie de dilución de las sustancias experimentales. Los procedimientos de preparación y de almacenaje son iguales a los utilizados para ARTOXKIT M.

3.3.1.1.3 Eclosión de los Quistes

La eclosión de los quistes se inició 24 horas antes de iniciar las pruebas de toxicidad en *A. salina* y 20-22 horas antes de las pruebas en *T. platyurus*. Se siguieron los siguientes pasos:

1. Aireado del medio de dilución que se utilizó para la eclosión (30 minutos).
2. Prehidratación de los quistes introduciendo 1ml de agua de disolución en el vial con quistes y agitando a intervalos regulares durante 30 minutos.
3. Vaciado del contenido del vial con quistes en una caja de Petri asegurándose que la mayoría de quistes fueran transferidos.
4. Se añadió 40ml de agua estándar en la caja de Petri, agitando suavemente con movimiento

circular para distribuir homogéneamente los quistes.

5. Se cubrieron las cajas Petri, exponiéndolas a una fuente de luz fluorescente (1000-4000lux) por una hora e incubó a 25°C en la oscuridad por 24 horas para *A. salina*. *T. platyurus* se incubó a 25°C con iluminación constante (4000 lux) entre 20-22 horas.

3.3.1.2 Preparación de la Serie de Dilución de la Sustancia (tóxico), Llenado de Placas, Pruebas de Determinación de Rango y Definitiva e Incubación: Día 2

3.3.1.2.1 Preparación de la Serie de Dilución del Tóxico

Aunque la toxicidad aproximada de los extractos y fármacos es conocida, no se procede directamente a la Prueba Definitiva. Se llevó a cabo primero la Prueba para Determinación de Rango.

Para la Prueba para Determinación de Rango se modificó el Procedimiento Estándar de Operación se preparó una serie de dilución: 1000mg/l, 100mg/l, 10mg/l, 1mg/l y 0.1mg/l de cada sustancia (**Cuadro 1**). Para algunas sustancias que no presentaron actividad en este rango, se duplicaron las concentraciones de la serie de dilución.

Cuadro 1. Serie de dilución del compuesto

Tubo de Ensayo	Concentración del Químico (mg / l)
1	1000
2	100
3	10
4	1
5	0.1

3.3.1.2.2 Llenado de la Placa - Prueba de Determinación de Rango

Las pruebas se llevaron a cabo con organismos vivos y vigorosos, *A. salina* de 24 horas y *T. platyurus* de 20-22 horas.

Cada dilución de tóxico (en triplicado) fue transferida a los pozos de una columna en la placa multipozos. Los pozos se numeraron de 1 a 6 horizontalmente y de A a D verticalmente. La distribución de las soluciones experimentales siempre se llevó a cabo empezando del control (izquierda, columna 1) hacia la concentración más elevada (derecha, columna 6). El control se realizó añadiendo 1 ml de agua de dilución a cada pozo de la columna 1 (pozos A1, B1, C1, D1), se añadió también 1ml de cada dilución de la sustancia en el pozo correspondiente.

Transferencia de Larvas a los Pozos

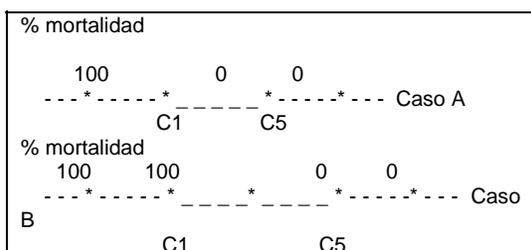
La transferencia de las larvas a la placa multipozos se realizó en dos pasos:

- a. Transferencia de las larvas de la caja Petri a los pozos de enjuague de la placa multipozos (A1 a A6).
- b. Transferencia de las larvas de los pozos de enjuague a los 3 pozos con 1ml cada uno de dilución.

3.3.1.2.3 Prueba Definitiva

La serie de diluciones ensayadas en la Prueba Definitiva abarcó el rango de la concentración más baja produciendo 100% de mortalidad y la concentración más alta produciendo 0% de mortalidad en la Prueba de Determinación de Rango. Este rango podía abarcar un orden de magnitud (caso A) o dos ordenes de magnitud (caso B) como se indica en el **Cuadro 2**. Este rango de concentración será llamado C1-C5.

Cuadro 2: Representación diagramática de el 100% y el 0% del rango de concentración de mortalidad, como se ha determinado en la Prueba de Determinación de Rango



Caso A : C1-C5 abarca un orden de magnitud

En este caso la concentración C1 se preparó en duplicado (2 tubos de ensayo).

1. Se añadieron los volúmenes de agua de dilución como se indica en el **Cuadro 3**, a los tubos de ensayo respectivos.
2. Se añadieron los volúmenes del tóxico de concentración C1 como se indica en el **Cuadro 3**.
3. Los tubos de ensayo se taparon con parafilm y agitaron.

Cuadro 3. Serie de dilución C1 - C5

Tubo de Ensayo	Agua de Dilución (ml)	C1 (ml)
C1	0	10
C2	4.4	5.6
C3	6.8	3.2
C4	8.2	1.8
C5	9.0	1.0

4. Se calculó la concentración actual de C1, C2, C3, C4 y C5 (utilizando la siguiente figura para el cálculo de CL 50)

$$C1 = \dots\dots\dots \text{mg/l}$$

$$C2 = 0.56 \times C1 = \dots\dots \text{mg/l}$$

$$C3 = 0.32 \times C1 = \dots\dots \text{mg/l}$$

$$C4 = 0.18 \times C1 = \dots\dots \text{mg/l}$$

$$C5 = 0.10 \times C1 = \dots\dots \text{mg/l}$$

5. Se procedió a llenar la placa, según el procedimiento descrito en la sección **4.3.1.2.2**

Caso B : C1-C5 abarca dos orden de magnitud

En este caso la concentración C1 se preparó una vez.

1. Se añadieron los volúmenes de agua de dilución como lo indica el **Cuadro 4** a los tubos de ensayo respectivos.

2. Se añadieron los volúmenes del tóxico de concentración C1 como lo indica el **Cuadro 4**.
3. Se taparon y agitaron los tubos de ensayo.

Cuadro 4: Serie de dilución C1 - C5

Tubo de Ensayo	Agua de Dilución (ml)	C1 (ml)
C1	0	10
C2	6.8	3.2
C3	9.0	1.0
C4	9.7	0.3
C5	9.9	0.1

4. Se calculó la concentración actual de C1, C2, C3, C4 y C5 (estas figura se necesitan para el calculo de DL 50)

$$C1 = \dots\dots\dots \text{mg/l}$$

$$C2 = 0.32 \times C1 = \dots\dots \text{mg/l}$$

$$C3 = 0.10 \times C1 = \dots\dots \text{mg/l}$$

$$C4 = 0.03 \times C1 = \dots\dots \text{mg/l}$$

$$C5 = 0.01 \times C1 = \dots\dots \text{mg/l}$$

5. Se procedió a llenar la placa, según el procedimiento descrito en la sección **3.3.1.2.2**

3.3.1.2.4 Incubación de la Placa de Ensayo

Se colocó una tira de parafilm sobre la placa y se puso la cubierta sobre ella. Luego se colocó la placa multipozos en la incubadora a 25 °C en la oscuridad, por 24 y 48 horas para *A. salina* y 24 horas para *T. platyurus*.

3.3.1.3 Evaluación de los Resultados: Día 3

Se sacó la placa de la incubadora y colocó debajo del microscopio de disección. Se verificaron todos los pozos de las filas A, B y C, registrándose el número de larvas muertas. Las larvas fueron consideradas muertas si no mostraban ningún movimiento después de 10 segundos de observación. Si la mortalidad de los controles excedía el 10%, el bioensayo hubiera sido considerado inválido y repetido de nuevo.

Se calculó el porcentaje de mortalidad para cada dilución, para utilizar esta información en el cálculo de CL50, por medio del método computarizado USEPA 1985 (6).

3.3.3 Procedimiento Estándar de Operación A. salina convencional (basado en el ensayo descrito por Solis et al., 1993)

A este método se le llamará "convencional" en el resto del trabajo.

3.3.3.1 Preparación del agua de mar

Para la preparación del medio de dilución se siguieron los siguientes pasos:

1. Disolución de 35 g de la sal de mar en un litro de agua destilada.
2. Se marcó el vaso de precipitar para indicar el volumen de agua.
3. Se hirvió por 30 minutos y completó el volumen que se evaporó según la marca.
4. Se filtró y refrigeró hasta el momento de usar.

	<i>A. salina</i> kit	<i>A. salina</i> convencional	<i>T. platyurus</i>
Sustancia 1 fármaco/extracto	✓	✓	✓
.			
Sustancia 15 fármaco/extracto	✓	✓	✓

3.3.3.2 Cultivo de *A. salina*

Se colocó el agua en la "pecera" y agregaron 40 mg de huevecillos en el área cerrada (lado oscuro). Se incubó por 48 horas a temperatura ambiente y con luz artificial incandescente. Al eclosionar, los nauplios (larvas) pasaron al área abierta de la pecera (lado con luz). Se sacaron a las 24 horas las larvas que eclosionaron y se utilizaron las que eclosionaron en las últimas 24 horas.

3.3.3.3 Determinación de la Citotoxicidad

Para la determinación de la citotoxicidad de pesó 20mg del extracto a ensayar y disolvió con 10ml de agua de mar. Se agregaron por triplicado en una microplaca (96 pozos): 100 µl del extracto disuelto + 100 µl de agua de mar con 10-15 nauplios. Se realizó un control negativo con: 100 µl de agua de mar, 100 µl de agua de mar con 10-15 nauplios. Luego se incubó a temperatura ambiente con luz artificial (incandescente) por 24 horas.

En el caso de *O. micranthum*, el aceite se solubilizó utilizando DMSO (2mg de aceite/40µL de DMSO/1.9mL de agua de mar). Se realizó el control con dicha sustancia, comprobando que la toxicidad no sería debido a ella.

A las 24 horas se contaron en el estereoscopio o microscopio el número de nauplios muertos. Se agregó metanol a los pozos, esperando 15 minutos, contando de nuevo todos los nauplios. Si se observaban nauplios muertos en el control negativo la prueba no era válida y había que repetirla de nuevo.

3.3.3. 4 Interpretación

Se calculó el % de nauplios muertos:

1. Sumando el número de camarones muertos en los tres pozos (X).
2. Sumando el número total de camarones en los tres pozos (Y).
3. Dividiendo X dentro de Y y multiplicando por 100.

Si el % de camarones muertos era mayor del 50%, se repetía la prueba utilizando concentraciones de 1.0, 0.5 y 0.25 mg/ml, obteniendo los valores de X y Y en cada concentración y determinando el valor de CL50 con el programa de computadora Finney. Sin embargo, para la comparación del estudio se corrieron los resultados utilizando el método computarizado de la USEPA (6).

3.5 Diseño de la Investigación

La actividad citotóxica con *A. salina* y *T. platyurus* se expresó como CL50 o concentración letal media, es decir, la concentración que mata el 50 % de los nauplios. Se realizó una comparación de los resultados obtenidos con el fin de analizar qué método era más sensible. Así mismo se compararon varios parámetros tales como la disponibilidad, tiempo, etc. que requería cada metodología por ser éste un aspecto muy

importante en el uso de métodos de investigación. El ensayo, por conveniencia, consistió en un análisis (triplicado) por extracto o fármaco (por limitación de kits de *A. salina* y *T. platyurus*) para cada tratamiento. Se realizó un diseño de bloques al azar como se indica en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Diseño de Bloques al Azar

3.5 Análisis Estadístico de la Investigación

Se realizó un análisis de varianza de dos vías con el programa estadístico para Macintosh StatView 1.5, ya que la hipótesis aseveraba que las tres metodologías poseían diferencias significativas de sensibilidad.

3.5.1 Hipótesis Nula

La CL50 de cada ensayo es igual en los tres métodos utilizados.

Si existía diferencia significativa se realizarían comparaciones pareadas por la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (LSD, con el programa estadístico antes mencionado).

4. RESULTADOS

4.1 Pruebas preliminares

En la prueba convencional de *A. salina* (Solis *et.al.*,1993) se realiza un paso preliminar que consiste en una prueba de letalidad con una solución de 1 mg/l. Si no hay letalidad, el extracto es considerado sin actividad. Las pruebas preliminares con método convencional de *A. salina* (Solis *et.al.*, 1993) no se realizaron debido a que los extractos utilizados en la investigación fueron proporcionados por el Departamento de Citohistología, y probados con anterioridad por ellos. Determinaron que la hoja de *S. americanum* (quilete), corteza de *G. sepium* (madrecacao), hoja de *N. lobata* (tres puntas), raíz de *P. alliaceae* (apacín) y aceite de *O. micranthum* (albahaca) sí poseen actividad citotóxica. Asimismo, comprobaron que la hoja de *C. americana* (lengua de vaca), hoja de *P. barbata*, hoja de *Q. crispifolia* (encino), corteza de *R. mangle* (mangle) y rizoma de *S. domingensis* no poseen actividad citotóxica contra *A. salina*.

Los Toxkits requieren también de una prueba preliminar para encontrar el rango de concentración en la que se puede encontrar la CL50. Se observó que 5 de 15 sustancias tuvieron actividad con Artoxkit y 11 de 15 con Thamnotoxkit..

4.2 Pruebas definitivas (determinación de CL50)

Los valores de CL50 (expresados en mg/l o ppm) fueron obtenidos con métodos computarizados de la USEPA (principalmente Moving Average, y cuando fue necesario, Binomial Test o Probit). Si una muestra tuvo actividad con más de 1000 ppm significa que no hay actividad.

Los tres organismos fueron susceptibles a la furosemda, acetaminofén, *P. alliaceae* y *O. micranthum*; no así a *C. americana*, amoxicilina, cefalexina y el secnidazol. La *A. salina* (Artoxkit) fue más susceptibles a *O. micranthum* y furosemda y no presentó letalidad por *R. mangle*, *P. barbata*, *Q. crispifolia* ni *S. domingensis*. La *A. salina* convencional solamente presentó letalidad a *P. alliaceae*, *O.*

micranthum, furosemda y acetaminofén. *T. platyurus* fue el más susceptible a *S. americanum*, *P. alliaceae*, *N. lobata*, *G. sepium* y acetaminofén. En el **Cuadro 6** se muestran los resultados (CL50) obtenidos en las pruebas definitivas con *A. salina* y *T. platyurus* con los diferentes extractos y fármacos.

4.3 Análisis Estadístico

Las comparaciones fueron realizadas por separado con los tres grupos de sustancias analizadas: con actividad anti-*Artemia* conocida, sin actividad anti-*Artemia* conocida y fármacos. Para la comparación se utilizaron los resultados de Artoxkit de 48 horas y de *A. salina* convencional de 24 horas. El programa estadístico computarizado utilizado para analizar los resultados fue StatView 1.5.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías porque la hipótesis asevera que las tres metodologías presentarían diferencias significativas de sensibilidad. Como hubo diferencia significativa, se realizaron comparaciones pareadas por la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (MDS). Esto se detalla a continuación.

El análisis de varianza de los resultados de los tres bioensayos para las sustancias con actividad anti-*Artemia* y de fármacos presentaron valores P de 0.613 y 0.5628, respectivamente. Por lo tanto, se demuestra que no hay diferencia significativa (diferencia significativa $P < 0.05$) entre los tres bioensayos. Sin embargo, el análisis de varianza de los extractos sin actividad anti-*Artemia* presentó un valor P 0.0472, demostrando que sí hay diferencia significativa. Debido al valor P obtenido se realizó una comparación entre los bioensayos (MDS-diferencia significativa mínima). Esta comparación se presenta por grupos en el **Cuadro 7**.

Cuadro 7. MDS - ANOVA de una vía comparando CL50 de extractos sin actividad anti-*Artemia*

Comparación	Diferencia Significativa	PLSD Fisher
Artoxkit-Thamnotoxkit	-152	133.726*
Artoxkit-A. <i>salina</i>	0	133.726
Thamnotoxkit-A. <i>salina</i>	152	133.726*

*Significativo a 95%

Según el análisis estadístico, hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos con Thamnotoxkit y Artoxkit y entre Thamnotoxkit y *A. salina* convencional. Entre Artoxkit y *A. salina* convencional no hay diferencia significativa estadísticamente. Se puede observar en los resultados (**Cuadro 6**) que existe diferencia, sin embargo, esta diferencia no es mínima, por lo tanto no es determinada como diferencia significativa mínima.

Sin embargo, simplemente observando el **Cuadro 6**, el hecho que *T. platyurus* presentara más susceptibilidad que *A. salina* y haya mostrado toxicidad en extractos que no mostraron toxicidad para ninguno de los dos bioensayos con *A. salina*, resulta obvio que es una prueba que proporciona información que los ensayos con *A. salina* no proporcionan, ni podrían proporcionar. De la misma manera se puede decir de los extractos con actividad conocida que no afectaron a

A. salina convencional pero sí afectaron a Artoxkit. Es importante mencionar que el único extracto que presentó mayor actividad *A. salina* que *T. platyurus* es el *O. micranthum*, pudiendo deberse esto al DMSO, medio de solución del extracto.

5. DISCUSION DE RESULTADOS

Se puede observar en los resultados, que *A. salina* convencional y Artoxkit muestran resultados diferentes. Así mismo, se evidencia que *T. platyurus* es más sensible que Artoxkit y *A. salina* convencional, para el tamizaje de plantas con actividad biológica. Sin embargo, al realizar la comparación estadística de los tres bioensayos se logró probar únicamente diferencia significativa de los bioensayos en el análisis de extractos sin actividad anti-*Artemia*. Dichos resultados pueden deberse a que las diferencias que presentaban los valores de CL50 fueron grandes, por lo tanto fue imposible determinar una mínima diferencia significativa.

Al comparar los resultados entre Artoxkit - *A. salina* convencional, se puede observar que sólo 2 de los 5 extractos con actividad anti-*Artemia* conocida tuvieron algún efecto en *A. salina* convencional, mientras que estos y otros 2 más tuvieron actividad con Artoxkit. Un extracto no mostró actividad en ninguno de los 2 ensayos, quizás porque el extracto presento concentraciones bajas de principios activos o podría haber perdido actividad biológica por haber estado refrigerado durante mucho tiempo. En todo caso, Artoxkit tuvo LC50 más bajas (más susceptibilidad) e intervalos de límites de confianza estrechos (exactitud y poca variabilidad). Sin embargo, a pesar de esto, la diferencia no fue significativa según el análisis estadístico. Pero para fines prácticos, con los resultados de este estudio, se puede asumir que Artoxkit es más susceptible que *A. salina* convencional. *A. salina* convencional tuvo susceptibilidad a 4 de las 15 sustancias evaluadas y Artoxkit a 6 de las 15 sustancias evaluadas.

En la comparación de Thamnotoxkit - Artoxkit y *A. salina* convencional, se pudo observar que 4 de los 5 extractos sin actividad anti-*Artemia* conocida mostraron actividad contra Thamnotoxkit, mientras ninguno mostró actividad contra los dos ensayos con *A. salina*. Así mismo, en los extractos con actividad anti-*Artemia* presentó mayor susceptibilidad. Estadísticamente y para fines prácticos, Thamnotoxkit es más susceptible que cualquiera de los bioensayos con *A. salina*. Esto es una gran ventaja, pues si se usa este tipo de bioensayo como prueba de pretamizaje, se obtienen resultados más significativos que con *A. salina*. De hecho, se han realizado pruebas con estos extractos sin actividad anti-*Artemia* conocida en organismos patógenos, y resulta que presentan propiedades biocidas.

Se puede observar, así mismo, que los resultados con Thamnotoxkit presentan LC50 más bajas (más susceptibilidad) e intervalos de límites de confianza estrechos (exactitud y poca variabilidad).

Los organismos presentaron actividad con furosemda y acetaminofén. Es importante mencionar que probablemente no mostraron actividad alguna con

amoxicilina, cefalexina y secnidazol, debido a que el mecanismo de acción de los fármacos no produce un efecto agudo de letalidad a los organismos y quizá por la diferencia fisiológica y metabólica entre los crustáceos y microorganismos patógenos sobre los que actúan los fármacos.

Las diferencias observadas en los resultados pueden deberse a factores/condiciones discutidos a continuación. Por motivos de espacio y facilidad de lectura, esta información se presenta en el **Cuadro 8**. Aquí se comparan varios parámetros metodológicos, desde la selección de organismos, hasta la forma de determinar las CL50.

6. CONCLUSIONES

1. *T. Platyurus* es más sensible que *A. salina* del Artoxkit y que *A. salina* convencional para el tamizaje de plantas con actividad biológica.
2. El medio de agua dulce permite mayor solubilidad de los principios activos de las plantas y los fármacos, que el medio salino.
3. El uso de quistes (kits) producidos bajo control de calidad y específicamente para ensayos de letalidad, asimismo ensayos de condiciones controladas (oxigenación, luz, temperatura, número de organismos) conlleva a mejores resultados.
4. La realización de un ensayo preliminar, "range finding", orienta para la realización de la prueba definitiva.

7. RECOMENDACIONES

1. Efectuar estudios más extensos con *T. platyurus* y *A. salina*, con un mayor número de extractos vegetales.
2. Considerar al *T. platyurus* como un organismo sustituto de *A. salina* cuando éste sea producido en cantidades tan grandes como *A. salina*.
3. Experimentar en menores concentraciones de agua salada ya que la *A. salina* tolera un rango amplio de salinidad.
4. Establecer cambios en el ensayo de *A. salina* convencional como: número de organismos por pozo, control de luz y temperatura en la eclosión de quistes, mayor control en la edad de organismos utilizados en los ensayos.

8. REFERENCIAS

1. Sam, T.W. 1993. Toxicity testing using the brine shrimp: *A. salina* in bioactive natural products.

Detection, isolation and structural determination. Colegate, S.M. and R.J. Moluneux . CRC Press, Boca Raton. pp: 442-454.

2. Persoone, G.; Claus , C. & Jaspers, E. (Eds). 2000. New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring. Plenum Publishers, New York. 550p.
3. Artoxkit M. 1990. *Artemia* toxicity screening test for estuarine and marine waters. Standard Operational Procedure. Creasel, Deinze, Belgium. 22 p.
4. Thamnotoxkit F. 1995. Crustacean toxicity screening test for freshwater. Standard Operational Procedure. Creasel, Deinze, Belgium. 23 p.
5. Cáceres, A. 1999. Manual de procedimientos del proyecto biodiversidad tropical centroamericana. OEA. pp:9-12.
6. USEPA1985.Methods for Measuring the Acute Toxicity of effluents to fresh water and marine organisms. 3rdEdition. TOXDAT. Multimethod Program. EPA/600/4-85/013

Cuadro 6. Concentraciones letales medias (CL50) y límites de confianza de extractos vegetales y fármacos en bioensayos con *A. salina* y *T. platyurus*

Extracto/ Sustancia	Artoxkit 24h CL50*	Artoxkit 48h CL50*	Thamnotoxkit CL50*	<i>Artemia salina</i> 24h CL50*
Con Actividad anti-<i>Artemia</i> conocida				
<i>S. americanum</i>	1 (0.77-2.81)	565 (380-845)	219 (173-281)	0
<i>O. micranthum</i>	32 (23-43)	25 (20-32)	101 (73-139)	405(302-509)
<i>P. alliaceae</i>	481 (367-669)	135 (100-187)	12 (9-14)	228(157-271)
<i>G. sepium</i>	0	0	492 (399-587)	0
<i>N. lobata</i>	0	902(794 –1032)	251(225-274)	0
Sin actividad anti-<i>Artemia</i> conocida				
<i>C. americana</i>	0	0	0	0
<i>R. mangle</i>	0	0	84 (63–110)	0
<i>P. barbata</i>	0	0	405 (344–486)	0
<i>Q. crispifolia</i>	0	0	201(177–226)	0
<i>S. domingensis</i>	0	0	70 (52-92)	0
Fármacos				
Furosemida	566	77 (58-102)	581 (523-647)	308(182-403)
Amoxicilina	0	0	0	0
Cefalexina	0	0	0	0
Secnidazol	0	0	0	0
Acetaminofén	320 (100-1000)	163 (100-1000)	34(30-39)	471(396-554)

* CL50 >1000 ppm = 0

Cuadro 8. Comparación de aspectos metodológicos de los 3 bioensayos utilizados

Parámetro	A. salina	Artoxkit M	Thamno-toxkit F	Observaciones
Quistes producidos bajo control de calidad y específicamente para ensayos de letalidad	No	Si	Si	Las cepas de los kits son cepas seleccionadas especialmente para pruebas de toxicidad debido a su susceptibilidad. La <i>A. salina</i> del ensayo convencional, es producida para ser alimento vivo de peces de acuario.
Medio estándar para eclosión y para bioensayo	Agua salada	Agua salada	Agua dulce	La mayor ventaja de la utilización del <i>T. platyurus</i> en los ensayos es que el medio utilizado provee mayor disolución del extracto/ sustancia, lo que implica disolución de los principios activos. Esto conlleva a mayor biodisponibilidad de los mismos. El agua salada es sobresaturada pudiéndose mejorar la solubilidad de los principios activos si fuera menor la salinidad. Se intentó trabajar con diclofenaco sódico en pruebas preliminares y no se logro su solubilización en agua salada, pero si en agua dulce. Por lo tanto, no se utilizó como fármaco de experimentación.
Oxigenación del medio previo a eclosión de quistes	Si	Si	Si	Se oxigena para aumentar la eclosión. Así mismo, se asegura que la letalidad de los organismos será debido a las sustancias y no por falta de oxígeno.
Fuente de luz para eclosión de quistes	Incandescente	Fluorescente (4000 lux) por 1 hora, luego oscuridad	Fluorescente (4000 lux)	La luz Incandescente da calor y la fluorescente no, pudiendo esto representar diferencias en la eclosión de los organismos. Se logra únicamente fotoestímulo con la fluorescente, exponiendo a los organismos a fotoestímulo y calor, que podría ser dañino y letal a los organismos y que evapora, por lo tanto, reduce el volumen del medio.
Temperatura de eclosión y de ensayo	No controlada	25 ± 1°C	25 ± 1°C	Se mantiene temperatura constante con los kits, incidiendo dicho control, diferencias en el % de eclosión de los organismos. En el método convencional no existe un control de temperatura. Por lo tanto, esta aumenta y disminuye, dependiendo del medio ambiente.
Tiempo que se espera para la eclosión de los quistes	48h	24h	18-22h	Se descartan los nauplios de la prueba convencional eclosionados las primeras 24h y se utilizan los que eclosionan en las siguientes 24 horas.
Volumen (mL) de muestra en cada pozo	0.4	1	1	Probablemente hay más oxígeno disuelto en las de mayor volumen.
Número de diluciones de muestra en cada placa para cada muestra	3	5	5	Probablemente hay más exactitud entre más concentraciones son evaluadas.
Placa multipozos usada	96 pozos	24 pozos	24 pozos	En los 3 métodos, cada dosis de extracto se evalúa por triplicado.
Número de organismos por pozo	Entre 10-15	10	10	Es probable que mientras más volumen de muestra se utilice y entre menor número de organismos existen, hay más oxígeno disponible
Número de organismos por ensayo	No controlado	30	30	30 individuos es un número estadísticamente confiable. En el método convencional no es controlado ya que en cada pozo pueden existir entre 10-15 nauplios, por lo tanto, el número total de organismos no es el mismo siempre
Duración del bioensayo	24h	48h	24h	Artoxkit dura 48 horas debido a que el fabricante lo recomienda desde hace algún tiempo. Determinaron que los controles pueden vivir 48 horas, y en este tiempo hay más oportunidad de observar efectos tóxicos, aumentado así la sensibilidad. De todas formas se hacen lecturas a las 24 horas.
Ensayo para rango de acción (range finding)	Si, pero sin diluciones	Si, con diluciones	Si, con diluciones	El realizar ensayo de búsqueda de rango de acción con diluciones disminuye el trabajo posterior y limita a un rango de donde se encontrará la CL50. Efectuar pruebas con un rango menor de concentraciones da como resultado un intervalo de confianza más estrecho y un resultado más confiable.

