

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



**ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOCIDA, CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA DE  
TRES PLANTAS MEDICINALES DE LA FAMILIA EUPHORBIAEAE:  
*EUPHORBIA LANCIFOLIA*, *CNIDOSCOLUS ACONITIFOLIUS* VAR. *MANSA* Y  
*CNIDOSCOLUS ACONITIFOLIUS* VAR. *ESTRELLA*.**

ANA ASUCENA YOC CANEL  
ELVIA VERÓNICA SOTO LÓPEZ  
JORGE LUIS GUTIÉRREZ MONTUFAR  
MARÍA ALEJANDRA ARRIOLA NAVAS

QUÍMICOS BIÓLOGOS  
GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2012

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



**ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOCIDA, CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA DE  
TRES PLANTAS MEDICINALES DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE:  
*EUPHORBIA LANCIFOLIA*, *CNIDOSCOLUS ACONITIFOLIUS* VAR. *MANSA* Y  
*CNIDOSCOLUS ACONITIFOLIUS* VAR. *ESTRELLA*.**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR  
ANA ASUCENA YOC CANEL  
ELVIA VERÓNICA SOTO LÓPEZ  
JORGE LUIS GUTIÉRREZ MONTUFAR  
MARÍA ALEJANDRA ARRIOLA NAVAS

PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
QUÍMICOS BIÓLOGOS

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2012

## **JUNTA DIRECTIVA**

Oscar Cobar Pinto, Ph. D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M. A.	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M. A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fausto René Beber Garcá	Vocal IV
Br. Carlos Francisco Porras López	Vocal V

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A DIOS:**

Por darnos la oportunidad de crecer espiritual e intelectualmente.

### **A UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA:**

Por ser nuestra *alma mater*, centro que nos acogió durante estos años de estudio y nos dio la oportunidad de adquirir conocimiento y forjar mucho más que una profesión.

### **A FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA:**

Por ser nuestro segundo hogar y por permitirnos pasar dentro de sus aulas viviendo buenos y difíciles momentos así como por crear en nosotros el amor a nuestra carrera.

### **A DEPARTAMENTO DE CITOLOGÍA:**

Por darnos la oportunidad de formarnos como profesionales y acogernos como compañeros y amigos a lo largo de nuestra investigación.

### **A LICDA. MARGARITA PAZ, LICDA. MARIA EUGENIA PAREDES Y LIC. ARMANDO CÁCERES:**

Por su valiosa asesoría y revisión que fue una inigualable guía que logró enriquecer este proyecto.

### **A LICDA. ISABEL GAITÁN Y LICDA. MARIA CRISTINA QUINTANA:**

Por su ayuda, orientación y apoyo en la realización de esta investigación.

## **ACTO QUE DEDICO**

**ANA ASUCENA**

**A DIOS:** Por ser mi creador, Protector, Poderoso, Único, Santo, Providente, Fiel, Justo, Amoroso y Misericordioso y me ha llenado de sabiduría en todo momento.

**A LA VIRGEN MARÍA:** Por ser Madre, Modelo de Mujer e Intercesora.

**A MIS PADRES:** María Juana y Francisco a quienes amo profundamente y agradezco su apoyo incondicional, cariño y comprensión en cada etapa de mi vida.

**A MIS HERMANOS:** Francisco y Manuel por su apoyo, compañía, cariño y consejos.

**A MI CUÑADA Y SOBRINOS:** Por su apoyo y compañía.

**A MI FAMILIA:** Por todo su cariño y compañía.

**A MIS AMIGOS:** Gracias por esos recuerdos que quedaran en mi por siempre, se que cuento con ustedes en las buenas y en las malas.

**A TODAS LAS PERSONAS:** Que han estado conmigo y me han brindado su amistad, apoyo, bondad y consejos.

## **ELVIA VERÓNICA**

**A DIOS:** Por ser la fuente de sabiduría y luz que ilumina mi diario vivir. Gracias Padre.

**A LA VIRGEN MARÍA:** Por ser modelo de mujer, perseverancia y constancia virtudes que me han ayudado a lograr el día de hoy este triunfo.

**A MIS PADRES:** Jorge e Imelda por apoyarme en la aventura de mi vida y por ser pilares al forjar mi carácter y decisión.

**A MIS HERMANOS:** Sandra, Emilio, Mary, Mónica (QEPD) y Francisco, por sus consejos y apoyo incondicional.

**A MIS SOBRINOS:** Gerber, Lourdes, Dulce, Mónica y Fátima, por el cariño que me demuestran día a día.

**A MIS CUÑADOS:** Oscar y Luky, por formar parte de mi familia.

**A MIS AMIGOS:** de Iglesia, estudios y todas las personas que de alguna u otra forma han compartido un lazo de amistad. No es preciso decir nombres ya que cada uno sabe cuánto les aprecio.

**A USTEDES:** que me acompañan en este importante momento y por compartir este logro. Gracias.

**JORGE LUIS**

**A DIOS:** por llenar de amor mi vida, y permitirme culminar una etapa más.

**A MI ESPOSA:** María Alejandra, por la demostración de amor que me entregas todos los días, haciendo de mí un hombre mejor cada día. Me enseñaste que en las cosas pequeñas y sencillas se esconde lo más lindo de la vida. Te amo.

**A MI HIJA:** María Fernanda, que en sus ojos, conocí el amor de Padre, siendo la fuente de inspiración y fuerza en esta nueva etapa de mi vida.

**A MIS PADRES:** Marta y Marco Tulio, por su amor y apoyo incondicional, enseñándome que la vida tiene sentido cuando se tiene la capacidad de hacer el bien.

**A MI HERMANA:** Marta Estela, por estar siempre conmigo, acompañándome en las decisiones más importantes de mi vida, siendo el ejemplo vivo de amor y solidaridad. Hermana eres una gran bendición.

**A MI HERMANO:** Marco Antonio, gracias por tus consejos, por tu cariño, tu solidaridad y tu ejemplo. Un gran abrazo fraterno.

**A MIS AMIGOS Y AMIGAS:** con los que compartí, sueños, ilusiones, idearios, y luchas. No los nombro por que se que cada uno sabrá reconocerse en esta palabras. Los quiero mucho.

**A MARCOS Y A CAMILA:** por ser dos personas a las cuales quiero mucho, son parte esencial de mi vida.

**A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA:** mi *alma mater*, donde aprendí que la universidad es más que un cumulo de conocimiento, es y debe ser justicia, igualdad y verdad.

## **MARÍA ALEJANDRA**

**A DIOS:** fuente inagotable de amor, para que cada merito alcanzado con éste logro y todos los de mi vida, reflejen su gracia y sean bendiciones que pueda compartir con los que me rodean.

**A LA VIRGEN MARÍA:** por ser mi compañera y ejemplo de vida.

**A MI HIJA:** María Fernanda motor e inspiración de increíbles sueños.

**A MIS PADRES:** este triunfo es para ustedes, por ser mi cimiento, modelo a seguir y darme su ejemplo de vida, de familia y de profesionales.

**A MI ABUELITA:** Consuelo que ha inspirado esta meta.

**A MIS HERMANOS:** por su ejemplo, cariño y apoyo incondicional.

**A MI ESPOSO:** Jorge Luis Gutiérrez. Por ser amigo incondicional, compañero y socio de sueños.

**A:** Todas las personas que me brindaron su amistad y apoyo, y todos los que me acompañan en este momento y me honran con su presencia.

## I. AMBITO DE LA INVESTIGACION.

Guatemala posee gran biodiversidad de flora, lo que nos hace un país con alta potencialidad en el desarrollo de productos naturales medicinales, o de aplicación industrial para el desarrollo de nuevas drogas y agroquímicos. Su uso empírico ha permitido conocer sus propiedades útiles o nocivas (toxicidad) para ser utilizadas en beneficio del hombre (Cáceres, 1996). El estudio metodológico de las plantas medicinales, forma parte importante de un campo de interés basados en sus propiedades terapéuticas para desarrollar nuevos productos comerciales basados en los compuestos y principios activos que les confieren características tóxicas (Peña & Pérez, 2007; Sánchez, Fonseca, Capiro, & Fernández, 2000).

Los compuestos bioquímicos de la familia *Euphorbiaceae* son muy diversos y especialmente ricos en alcaloides y terpenoides, que les confieren actividad tóxica (Webster, 1986). Se distinguen por la combinación de savia lechosa y frutos secos; la savia, pelos urticantes o semillas suelen tener propiedades tóxicas en muchas variedades (Standley & Steyermark, 1949). Se han documentado diversas especies de la familia *Euphorbiaceae* que han sido utilizadas con fines terapéuticos en medicina popular (Beyra et al., 2004; Oryema, Bukenya-Ziraba, Omagor, & Opi, 2010; Luziatelli, Sorensen, Theilade, & Per, 2010; Muthu, Ayyanar, Raja, & Ignacimuthu, 2006).

Es importante para el país conocer y estudiar esta diversidad para desarrollar su potencial por medio de diferentes disciplinas científicas. Motivados en el proceso de desarrollo de conocimiento, en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por medio del Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, en la Unidad de Bioensayos bajo la línea de investigación de validación del uso de plantas medicinales nativas de Guatemala,

se evaluó la toxicidad *in vitro* de tres extractos de plantas medicinales de la familia *Euphorbiaceae* siendo estas: *Euphorbia lancifolia* Schltdl., conocido en Guatemala con el nombre de ixbut, besmut o sapillo, *Cnidoscolus aconitifolius* I.M. Johnst., en dos de sus variedades *Cnidoscolus aconitifolius* var. *mansa* (chaya mansa) y *Cnidoscolus aconitifolius* var. *estrella* (chaya estrella); con el fin de contribuir a evaluar los riesgos de su consumo prologando y la potencialidad para el desarrollo de nuevas drogas como terapia en infecciones producidas por microorganismos patógenos, control biológico de insectos y como agentes antitumorales.

## II. RESUMEN

Las plantas constituyen la mayor fuente de productos orgánicos que pueden ser útiles como materia prima para el desarrollo de nuevos aditivos alimenticios, fármacos y plaguicidas por lo anterior los estudios que proporcionan información científica que garantizan su uso tradicional así como aportan datos sobre su potencial de toxicidad son de gran importancia, dicha información viene a sumar nuevos avances dentro la investigación y descubrimiento de nuevos fármacos de origen natural en Guatemala.

El presente estudio evaluó la actividad biocida, citotóxica y genotóxica de tres extractos de plantas medicinales de la familia *Euphorbiaceae*, estas especies han sido ampliamente utilizadas dentro de la medicina natural atribuyéndoseles propiedades galactogoga y antiséptica en el caso de *Euphorbia lancifolia* (Ixbut); propiedades diurética, laxante, hipoglucemiante y fuente de alimentación en el caso de *Cnidoscolus aconitifolius* var. *mansa* (chaya mansa) y *Cnidoscolus aconitifolius* var. *estrella* (chaya estrella).

El tamizaje antibacteriano y antilevadura se realizó mediante el método de dilución en agar descrito por Mitscher y colaboradores. El tamizaje antibacteriano contra *Campylobacter jejuni*, se realizó por el método de difusión en agar. El ensayo antifúngico se realizó utilizando la metodología descrita por Brancato & Golding modificado por MacRae, Hudson, & Towers, para hongos filamentosos. A los extractos que mostraron actividad a una concentración de 1 mg/mL se les realizó la concentración inhibitoria mínima (CIM). El único extracto que presentó actividad inhibitoria *in vitro* significativa contra bacterias y hongos fue *E. lancifolia* con una CIM de 1 mg/mL contra *Bacillus subtilis* y *Trichophyton mentagrophytes* ( $p=0.0312$ ).

El ensayo frente a *Artemia salina* y la actividad larvicida se realizó según la metodología descrita por Meyer y colaboradores. Se calculó la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) para *A. salina*. Para el ensayo larvicida se calculó la concentración letal 100 (CL<sub>100</sub>). Todos los extractos mostraron actividad contra *A. salina* a concentraciones menores de 1 mg/mL. El extracto con mayor actividad fue *E. lancifolia* con valor de CL<sub>50</sub> de 0.128925 mg/mL.

El extracto con mayor actividad larvicida fue *C. aconitifolius* var. *estrella* con una CL<sub>100</sub> de 0.351647, contra larvas de primer estadio de *Anopheles albimanus*. Todos los extractos mostraron una CL<sub>100</sub> mayor a 1 mg/mL en larvas de primer estadio de *Aedes aegypti* y larvas de segundo estadio de *A. albimanus*.

Para la determinación de citotoxicidad y genotoxicidad se utilizó la prueba de *Allium cepa* L. descrita por Fiskesjö y modificada por Rank & Nielsen. *C. aconitifolius* var. *mansa*, *C. aconitifolius* var. *estrella* presentan actividad citotóxica y genotóxica significativa a concentraciones menores de 1 mg/mL ( $p < 0.0001$ ).

### III. ANTECEDENTES

#### A. Uso de plantas medicinales de la familia *Euphorbiaceae*

Las plantas medicinales son utilizadas por billones de personas en la mayor parte de los países en vías de desarrollo, debido a la falta de asistencia de los servicios de salud, su bajo costo y efectividad, así como las creencias y preferencias culturales (Shanley & Luz, 2003; Sheldon, Balick, & Laird, 1997).

La medicina Tradicional se utiliza ampliamente y rápidamente de forma creciente en el sistema de Salud. En África, el 80% de la población utiliza la medicina tradicional para ayudar a satisfacer sus necesidades de atención salud. En Asia y América Latina, la población continúa utilizando medicina tradicional como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales (World Health Organization [WHO], 2002). Se estima que en Guatemala exista un aproximado de 10,000 especies vegetales de las cuales tan solo un 15% son usadas con algún fin medicinal, fracción pequeña del total estimado en 250,000 especies de los bosques subtropicales de la región (Cáceres, 1996).

La familia *Euphorbiaceae* es la sexta familia más diversa dentro de las plantas con flores, con más de 321 géneros y 7550 especies (Kirkbride, Gunn, & Dallwitz, 2006). Se caracteriza por tener altas tasas de fotosíntesis y biomasa (Changying, Wenquan, Yun, Xin, & Weiping, 2009). Varios géneros están representados en América Central. Son plantas herbáceas, arbustos o árboles e incluso pueden encontrarse similares a cactus que crecen sobre todo en clima tropical, aunque también está bien representada en regiones templadas. La mayoría de las plantas de la familia se distinguen por la combinación de savia lechosa y frutos secos, con numerosas excepciones (Standley & Steyermark, 1949). Evolutivamente

se han diversificado fisiológicamente y adaptado rasgos complejos para adaptarse a la dinámica ambiental.

Se han atribuido efectos curativos a especies de la familia *Euphorbiaceae* desde la antigüedad; así por ejemplo *Euphorbia fischeriana* Steud. ha sido usada en la medicina tradicional China por más de 2,000 años, como una droga anticancerígena (Pan, Chang-Oi, & Chang, 1991). Otras plantas de esta familia se han usado para el tratamiento de cáncer, tumores y verrugas desde el tiempo de Hipócrates (Kupchan, Nelida, Branfman, Dailey, & Fei, 1976; Evans & Kinghorn, 1977).

Encuestas etnobotánicas en Guatemala reportan a 114 familias en 623 variedades de plantas utilizadas con fines medicinales, de las cuales las *Euphorbiaceae* se encuentran entre las familias más utilizadas (5.6%). Treinta y cinco son de la familia *Euphorbiaceae* (pertenecientes a 12 géneros) que se usan en el tratamiento de procesos infecciosos del sistema digestivo, respiratorio, genitourinario, afecciones dermatomucosas y parasitosis. (Cáceres, Alvarez, Ovando, & Samayoa, 1991; Cáceres, 1996). En el área de Mesoamérica se han reportado cerca de 15 especies de *Euphorbiaceae* (pertenecientes a 9 géneros) que se utilizan para tratar infecciones parasitarias causadas por protozoos, como la amebiasis, leishmaniasis, malaria, tricomoniasis y sarcoptiosis (Cambar, 1984).

Estudios etnobotánicos han demostrado el uso de varias especies de la familia *Euphorbiaceae* como plantas de uso medicinal, descritas a continuación: *Acalypha indica* Vell., es aplicada por vía tópica para el tratamiento de enfermedades de la piel. *Euphorbia antiquorum* Wall., es ingerido en dosis bajas de látex seco que ayuda al libre movimiento de las extremidades. En *Euphorbia hirta* L. el látex lechoso se aplica tópicamente para el tratamiento de heridas y labios partidos. El tallo de *Euphorbia tirucalli* Thunb., se prepara

en infusión para tratar enfermedades de la piel en niños. Las hojas frescas de *Phyllanthus amarus* Schumach., y *Phyllanthus emblica* L. se muelen y mezclan con leche de vaca o cabra, bebida utilizada para curar la ictericia y tos respectivamente. Para aumentar la secreción láctea en mujeres, se ingiere la infusión de *Euphorbia lancifolia* Schltld., savia de *Ricinus communis* L. o bien se atan sus hojas al pecho; de igual forma el aceite extraído de las semillas alivia el dolor de estómago al aplicarse en el abdomen en el caso de *R. communis* (Chellaiah, Muniappan, Nagappan, & Savarimuthu, 2006). *Croton socotranus* Balf. f. y *Euphorbia socotrana* Balf. f. son utilizadas para el tratamiento de enfermedades y heridas de la piel (Mothana, Lindequist, Gruenert, & Bednarski, 2009). *Croton reflexifolius* Kunth., *Euphorbia pulcherrima* Willd ex Klotzsch y *Jatropha gaumeri* Greenm., son utilizadas para el tratamiento de enfermedades dermatológicas y tumores en la piel (Ankli et al., 2002; Villarreal, Alonso, & Melesio, 1992). *Jatropha neopauciflora* Pax., es utilizada para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades y tumores de la piel (García & Delgado, 2006). Algunas especies han sido descritas en estudios por presentar actividad antibacteriana: *Croton lechleri* Müll.Arg., contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; *Hura crepitans* L. y *Jatropha macrantha* Müll.Arg contra *S. aureus* (Bussmanna et al., 2010).

Dentro de la familia *Euphorbiaceae* también hay muchas especies agrícolas económicamente importantes como el aceite de ricino (*R. communis*), la yuca (*Manihot esculenta* Crantz.), el árbol del caucho (*Hevea brasiliensis* Willd. ex A.Juss. Müll.Arg.) y el piñón (*Jatropha curcas* L.). El aceite de ricino es una importante materia prima para muchos productos industriales, tales como lubricantes y pinturas. La yuca es el sexto mayor cultivos básico en el mundo y su raíz posee alta cantidad de almidón ideal para la

producción de bioetanol. El árbol de caucho es el recurso más importante de caucho natural para los neumáticos y otros productos. Las semillas de piñón tienen alto contenido de aceite y pueden ser fácilmente transformados en biodiésel (Changying et al., 2009).

### **B. Toxicidad de la familia *Euphorbiaceae***

La familia *Euphorbiaceae* es conocida por el alto potencial tóxico que tienen varias de sus especies, esto se debe a la complejidad de muchos de sus compuestos bioquímicos, que son tóxicos para una gran variedad de especies que incluyen bacterias, hongos, insectos, y humanos (Webster, 1986; Rakshit, Devappa, & Klaus, 2010). La diversidad de compuestos bioquímicos que poseen son especialmente ricos en alcaloides y terpenoides que son en ocasiones promotores de la toxicidad de la planta; esta diversidad de compuestos es el resultado de la selección natural a través del tiempo para impedir el ataque de animales herbívoros. (Webster, 1986; Rakshit et al., 2010; Worbs, Kölher, Pauly, Avondet, & Schaer, 2011).

La concentración de toxinas en las diferentes especies de plantas dependen de varios factores que incluyen: estrés ambiental al que es sometida la planta, la edad, la susceptibilidad individual, el órgano de la planta que es consumido (raíz, tallo, hojas y semillas), y la temporada del año; mientras que el efecto de la toxicidad de cada especie depende de: el organismo expuesto, la fuerza de la toxina, el tiempo de exposición, el clima, el suelo, la cantidad que se consume y las diferencias genéticas dentro de la especie de planta. Algunas de las toxinas pueden producir daños irreparables a los depredadores, mientras que otras ejercen efectos transitorios (Rakshit et al., 2010).

El daño que ocasionan las plantas puede producirse en varios niveles dependiendo de la exposición; se ha reconocido casos de dermatitis alérgica y por contacto de irritación

primaria, causadas por la familia *Euphorbiaceae* (Webster, 1986). En varias especies de esta familia la savia es venenosa, o al menos altamente irritante, y las semillas a menudo tienen propiedades purgantes o son venenosas en grandes cantidades (Standley & Steyermark, 1949). Muchas de las plantas a nivel mundial, no son comestibles simplemente porque producen compuestos tóxicos (Rakshit et al., 2010). En los seres humanos la toxicidad por ingestión de compuestos naturales potencialmente tóxicos puede superarse con tratamiento convencionales y/o desaparecer tras un tiempo variable (Molyneux & Ralphs, 1992; Hoy, Head, & Hall, 1998; An, 2005).

En la familia *Euphorbiaceae*, algunas especies del género *Euphorbia*, y algunos otros géneros de la subfamilia *Euphorbioideae*, se ha encontrado que las resinas son muy tóxicas y potencialmente cancerígenas en animales a causa de las concentraciones de los diterpenos. Las semillas de *Croton*, *Euphorbia*, *Jatropha*, y *Ricinus* presentan actividades purgantes. Se ha reportado envenenamiento en humanos y ganado por ingerir plantas de la familia *Euphorbiaceae* que incluyen los géneros: *Excoecaria*, *Hyaenanche*, *Manihot*, y *Sapium* (Hecker & Schmidt 1974; Rakshit et al., 2010). Especies de *Euphorbia lutescens* C.A.Mey., *E. tirucalli*, al ser ingeridas pueden causar vómitos, trastornos estomacales, trastornos nerviosos, asfixia, coma y hasta la muerte. Se ha reportado que la hoja y tallo de *Cnidocolus aconitifolius* I.M.Jhonst., provoca al contacto con la piel urticaria e inflamación (Flores, Canto-Avilés, & Flores-Serrano, 2001).

En la literatura se hallan diversos ejemplos de especies de la familia *Euphorbiaceae* utilizadas en medicina popular (Beyra et al., 2004; Muthu et al., 2006; Oryema et al., 2010; Luziatelli et al., 2010), muchas de éstas especies se han clasificado como tóxicas (Webster, 1986; Worbs et al., 2011). La actividad biológica de extractos y compuestos de algunas

especies contrasta su toxicidad con sus propiedades terapéuticas. Varias especies de la familia *Euphorbiaceae* son importantes como fuentes de medicamentos, por ejemplo, algunos diterpenoides poseen potencial tóxico y otros potencial terapéutico como antihipertensivos, antirretrovirales, anti-inflamatorios, fármacos analgésicos y antibacterianos. Además a estas propiedades, estos compuestos pueden funcionar como antioxidantes, alucinógenos, y edulcorantes, y pueden estimular la contracción de del útero (Niu, Li, Zhao, & Lin, 2002; Kapil, Coul, Banergee, & Gupta, 1993; Bruneton, 1999; Kumari et al., 2003).

En modelos animales, la mayoría de terpenoides que favorecen tumores e irritación en piel exhiben ésteres basados en los diterpenos tigliano, daphnano, clerodant y esqueletos ingenano, mismos que han sido aislados de especies de la familia *Euphorbiaceae*. La ingestión de estos ésteres diterpeno producen síntomas de toxicidad grave en el ganado y los seres humanos (Kingsbury, 1964). De igual modo hay varios diterpenoides del tipo lathyrano, y esqueletos de casbano obtenidos de otras especies de *Euphorbiaceae*, que exhiben una gama de actividades biológicas, como antileucémicos, citotóxicos y antitumorales (Breitmaier, 2006).

Los diterpenos encontrados hasta la fecha, en las especies de la familia *Euphorbiaceae* ilustran las complejas estructuras químicas que poseen. En el aceite de *Croton tiglium* L. se encontró un diterpeno de la familia tigliane, un derivado del 4-epi-4-deoxyforbol, que es una mezcla de compuestos estrechamente relacionados que consta de un total de 25 ésteres de alcohol del diterpeno tigliane (forbol y 4-desoxi-4-alfa-forbol) (Kinghorn, 1991). El compuesto más abundante y biológicamente activo en el aceite de *C. tiglium* es el acetato de forbol tetradecanoico (TPA por sus siglas en inglés) (Hecker &

Schmidt, 1974). El forbol es un polialcohol diterpénico derivado del esqueleto básico tetracíclico denominado tigliano (Perdue, Blomster, Blake, & Farnsworth, 1979); en su forma libre no es tóxico, sin embargo muchos de sus diésteres, particularmente los 12, 13-disustituídos, presentan propiedades irritantes y son reconocidos por ser procarcinogénicos (Hecker & Schmidt, 1974).

Los compuestos de la serie del éster daphnano también se producen en mezclas complejas; la mayoría de los compuestos en esta clase son ésteres intramoleculares 9,13,14-orto-(2- ácido hexadecanoico). Los miembros de la serie del ingenol son muy irritantes y contienen alcoholes básicos de matriz terpénica como el 17-hydroxyingenol, ingenol, y-20-desoxi-17-hydroxyingenol (Kinghorn, 1991). Los diterpenos del tipo Clerodant mostraron actuar como vasodilatadores (Guerrero, Puebla, Carrón, Martín, & Roman, 2004). Especies de *Euphorbiaceae* mostraron sintetizar otros compuestos en semillas tales como lectinas, compuestos fenólicos, lignanos, fitatos, glúcidos cianogénicos, inhibidores de la tripsina, y de las proteínas inactivadoras de ribosomas (PIR), tales como curcina y la ricina, que contribuyen significativamente a la toxicidad de la planta en forma dependiente de la dosis-tiempo (Rakshit et al., 2010).

### **C. Evaluación de la toxicidad en plantas.**

El descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos son actividades difíciles, costosas y arriesgadas (Kunz-Schughart, Freyer, Hofstaedtert, & Ebner, 2004). El uso de las plantas medicinales en la terapéutica requiere, al igual que los productos sintéticos, de investigaciones previas y posteriores a su comercialización, en donde sigan siendo observadas mediante estudios de farmacovigilancia (García et al., 2009).

Las pruebas de toxicidad se realizan con el fin de identificar posibles daños para el ser humano ya que, se han detectado extractos de plantas medicinales que poseen actividad embriotóxica y/o teratogénica, y se ha reportado actividad mutagénica y carcinogénica en productos de origen vegetal (flavonoides y taninos), encontrándose que existe una correlación positiva entre la ocurrencia de enfermedades y tumores en la población (Carballo, Cortada, y Galano, 2005; Sánchez et al., 2000). El estudio de las plantas medicinales sugiere una ruta para su evaluación que consta de: selección de las plantas a investigar, identificación botánica correcta, características fitoquímicas mínimas, estudio farmacológico y estudio toxicológico, para decidir si se continúa o se abandona el uso tradicional (Sánchez et al., 2000).

Por razones éticas y económicas, y debido a la introducción de nuevas regulaciones en protección animal, los experimentos en animales deben ser reducidos al mínimo, para evaluar la toxicidad de los compuestos químicos. Tejidos y cultivos celulares de animales y humanos han sido utilizados como sistemas alternativos para la realización de pruebas toxicológicas de diversas clases de productos químicos (O'Hare & Atterwill, 1995). El cultivo de células y tejidos tienen varias limitaciones que incluyen difícil mantenimiento de su estabilidad durante experimentos a largo plazo, procedimientos complejos y costosos. Muchos experimentos *in vitro*, tienen el propósito de determinar el potencial de citotoxicidad de los compuestos estudiados, para demostrar su inocuidad al utilizarse como fármacos o cosméticos (Freshney, 2000).

## 1. Evaluación citotóxica

Los ensayos de citotoxicidad, son capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos que interfieren con la estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones; dentro de los que se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular (Repetto, 2002).

La configuración de los modelos experimentales empleados *in vitro* para valorar la toxicidad de los compuestos químicos se fundamenta en dos pilares básicos, que son el sustrato biológico y los indicadores de toxicidad. El sustrato es el material generalmente orgánico, vivo o no, sobre el que se aplica *in vitro* el xenobiótico. Estas alteraciones se valoran mediante indicadores de toxicidad, que son los parámetros que se determinan para cuantificar las modificaciones producidas en la estructura o fisiología del ensayo (Repetto, 2002).

Los ensayos de citotoxicidad se pueden clasificar en ensayos de viabilidad y ensayos de supervivencia, los primeros se emplean para determinar la proporción de células que inmediatamente después de un tratamiento potencialmente traumático, se mantienen intactas (Freshney, 2000). Mediante estos ensayos se puede evaluar la citotoxicidad de un tratamiento en términos de concentraciones letales. La concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) es la concentración de la sustancia de tratamiento que causa la muerte al 50% de las células presentes, evaluadas inmediatamente después del tratamiento (Cordero, 2002). El bioensayo de letalidad en *A. salina* (Meyer et al., 1982) se ha seleccionado como una prueba de pretamizaje de toxicidad general primaria, por su practicidad y conveniencia en

ensayos de citotoxicidad y ensayos antitumorales basados en células, y se evalúa en términos de  $CL_{50}$  (Anderson, Goetz, McLaughlin, & Suffness, 1991). Las pruebas de ecotoxicidad con plantas vasculares, entre ellas la prueba de *Allium cepa* (Fiskesjö, 1988), están demostrando una potencia diagnóstica significativa (Kristen, 1997). El bioensayo de *A. cepa* permite determinar la toxicidad total y genotoxicidad de diferentes agentes tóxicos o contaminantes (Fiskesjö, 1993), a partir de la observación del crecimiento y las mutaciones cromosómicas del ápice radical de la cebolla.

Se han desarrollado varias pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos celulares primarios y de órganos aislados como líneas celulares establecidas. Hoy en día las compañías farmacéuticas desean mejorar la eficiencia del descubrimiento y reducir los costos de investigación de fármacos; la presión para reducir la cantidad de ensayos preclínicos tradicionales *in vivo* en animales, no solo impulsado por problemas éticos, sino también causado por la pobre predicción de la respuesta en los seres humanos, ha potenciado el desarrollo de sistemas *in vitro*, que están siendo utilizados como alternativa experimental, para validar la toxicidad celular, la eficacia y los parámetros toxicocinéticos *in vitro*, basados en modelos de células de órganos perfundidos, segmentos de tejidos, modelos tridimensionales (3D) de tejidos y células madre (Griffith & Swartz, 2006; Cui et al., 2007). Entre estos métodos y tecnologías los modelos 3D son especialmente prometedores y podrían proporcionar una detección de drogas más precisa y la eliminación de compuestos tóxicos e ineficaces de una manera temprana, ahorrando tiempo y dinero en el desarrollo de nuevos medicamentos. Sin embargo hasta la fecha ningún modelo *in vivo* o sistema *in vitro* ha podido imitar las complejidades del cuerpo humano, por lo que para

maximizar el valor predictivo de los datos obtenidos en los sistemas modelo, deben ser evaluados todos los sistemas en combinación con la toxicología, la eficacia y los parámetros toxicocinéticos incluyendo los estudios tradicionales y de tamizaje (Kunz-Schughart et al., 2004).

## 2. Evaluación genotóxica

La genética toxicológica estudia los efectos mutagénicos de sustancias químicas y radiaciones, así como las consecuencias para la salud humana de la exposición a mutágenos, considerando como tal a cualquier agente que induzca mutaciones génicas (cambio de uno o pocos pares de bases), aberraciones cromosómicas estructurales (cambios en la estructura) o numéricas (aneuploidías y poliploidías por afecciones en los componentes del aparato mitótico o meiótico) o alteraciones al ADN (formación de aductos, alquilación de bases, intercalamiento de bases), a los mecanismos de reparación (incrementando la sensibilidad a los efectos de muchos mutágenos), a los eventos de recombinación mitótica (Hoffmann, 1996).

Las plantas medicinales no llevan una indicación metodológica especial para su evaluación genotóxica, por lo que deben ser sometidas a las mismas regulaciones que rigen los fármacos en general. La evaluación genotóxica de extractos de plantas medicinales deben ser realizadas, en primera instancia, mediante ensayos *in vitro*, validados internacionalmente, que midan el daño en los niveles de mutaciones genéticas y cromosómicas. (Sánchez et al., 2000).

En el mundo las guías o rutas críticas para los estudios genotóxicos persiguen como objetivo fundamental evidenciar qué tipo o a qué nivel de organización del ADN opera el daño causado por el compuesto evaluado. En concordancia con ello se reconocen cuatro

niveles: mutación génica (nivel I), mutación cromosómica (nivel II), daño primario del ADN (nivel III), transformaciones celulares (nivel IV), entre otras alteraciones. (Sánchez et al., 2000). Los ensayos pertenecientes a los dos primeros niveles son muy variados y ampliamente utilizados, en especial las pruebas *in vitro* que se caracterizan por tener una alta sensibilidad y precisión (Peña, Barrueco, Herrera, & García, 1990). En los últimos años las pruebas para medir daño a nivel primario del ADN, han alcanzado gran importancia entre los análisis de genotoxicidad (Guzmán-Rincón & Graf, 1995).

Si los resultados *in vitro* son negativos, debe continuarse, en segunda instancia, con ensayos *in vivo* que respondan a los mismos niveles de daño genético que se evaluaron *in vitro*. Una vez evaluados los niveles génico y cromosómico, con ensayos *in vitro* e *in vivo*, se deben incluir ensayos que midan daño primario al ADN y de acuerdo con el resultado obtenido, se debe tomar la decisión de realizar ensayos que midan otras alteraciones y carcinogenicidad. En cualquiera de los ensayos y niveles de daño evaluados se deben emplear protocolos estandarizados (validados internacionalmente) que tomen en consideración las dosis, el tipo de exposición y la vía de administración propuesta para el fármaco (Sánchez, et al., 2000).

Con el fin de detectar en sus etapas iniciales la acción sobre el material genético se utilizan las siguientes determinaciones *in vitro* que son muy utilizadas en nuestro medio para detectar genotoxicidad inicial: Aberraciones Cromosómicas (Au, Cajas-Salazar, & Salama, 1998; Preston et al., 1981), intercambio de cromátides hermanas (Bender, Griggs, & Beford, 1974; Shafer, 1982), micronúcleos (Au et al. 1998), mutaciones genéticas a nivel de Locus HPRT (Albertini, Nicklas, Skopek, Recio, & O'Neill, 1998), síntesis de ADN no

programada y electroforesis de una célula (ensayo del cometa) (Ashby, 1988; Carrano & Natarajan, 1988).

a. Niveles de daño sobre el ADN

Se reconocen los siguientes niveles y se describen algunas pruebas que podrían realizarse en nuestro país (Sánchez et al., 2000).

i. Nivel I: Ensayos para mutaciones génicas:

- Prueba de Ames (*Salmonella typhimurium*): La prueba utiliza cepas construidas por ingeniería genética, capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por dislocamiento del cuadro de lectura (*frameshift*) o por sustitución de pares de bases del ADN (Ames, McCann, & Yamasaki, 1975; Claxton, Houk, Monteith, Myers, & Hughes, 1991).
- Prueba de mutaciones puntuales en *Saccharomyces cerevisiae*: Diversas cepas haploides y diploides de la levadura pueden utilizarse para determinar la producción de mutaciones génicas por agentes químicos con y sin activación metabólica. (Deiters et al., 2003).
- Letalidad recesiva ligados al sexo en *Drosophila melanogaster* (SMART por sus siglas en inglés): La prueba de letalidad recesiva ligada al sexo descubre la aparición de mutaciones (mutaciones puntuales o pequeñas deleciones) en la línea germinal del insecto. Se trata de un análisis de mutación capaz de descubrir mutaciones en unos 800 loci de cromosoma X, lo que supone alrededor del 80% del total de loci existentes. El cromosoma X supone aproximadamente la quinta parte del genoma haploide completo. Las mutaciones del cromosoma X se expresan fenotípicamente en los machos portadores del gen mutante. Detecta la formación de

manchas en las alas de moscas expuestas durante el desarrollo; éstas pueden ser generadas por mutación puntual, pérdida, no disyunción y recombinación (Sánchez et al., 2000).

ii. Nivel II: Ensayos para mutaciones cromosómicas:

- Prueba citogenética *in vitro* en células de mamíferos: Las células deficientes en timidinkinasa (TK) a causa de la mutación TK<sup>+/-</sup> → TK<sup>-/-</sup> son resistentes a los efectos citotóxicos de la trifluorotimidina (TFT), análogo de la pirimidina. Las células capaces de producir timidinkinasa son sensibles a la TFT, que inhibe el metabolismo y detiene la división celular. Así pues, las células mutantes son capaces de proliferar en presencia de TFT, mientras que las células normales, que contienen timidinkinasa, no lo son. Del mismo modo, las células deficientes en HPRT o XPRT se seleccionan por su resistencia a la 6-tioguanina (TG) o la 8-azaguanina (AG). Si en los ensayos de mutación génica en células de mamífero se utiliza una sustancia de ensayo análoga a una base o un compuesto afín al agente selectivo, deben considerarse detenidamente sus propiedades, por ejemplo, cuando se sospeche que la sustancia de ensayo presenta toxicidad selectiva en las células mutantes y no mutantes. Así pues, habrá que confirmar la eficacia del sistema o agente de selección cuando se estudien sustancias de estructura afín a la del agente selectivo (Clive, McCuen, Spector, Piper, & Mavournin, 1983).
- Prueba citogenética *in vivo* en ratones: Los embriones de ratón en desarrollo, cuyos embriones en desarrollo se exponen a la sustancia estudiada. Los embriones son heterocigotos para cierto número de genes. Una mutación en el alelo dominante de tal gen o su pérdida en un melanoblasto provoca la expresión del fenotipo recesivo

en sus células descendientes, con la aparición de una mancha de otro color de pelo en el ratón resultante. La prueba descubre supuestas mutaciones en células fetales (Natarajan & Obe, 1986).

- Prueba de micronúcleos (ratones y CHO): De la línea celular CHO, obtenida a partir de un explante de tejido de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*), existen múltiples variantes mutacionales, lo cual amplía las posibilidades de su uso en el estudio de la genética de eucariontes. La línea original se caracteriza por ser aneuploides con un número modal cromosómico de 20-21, posee 10-13 marcadores cromosómicos bien definidos, su cariotipo no sólo tiene un número cromosómico moderado, sino que también es heteromórfico, por lo que se hace fácil la individualización de los tipos cromosómicos que lo integran. Como material de laboratorio es de fácil manejo, puede ser cultivada de diferentes formas y su mantenimiento es relativamente económico (Chu & Malling, 1968; Walton, Acton, & Stich, 1988).
- Prueba de dominantes letales en ratones: La letalidad dominante provoca la muerte del embrión o feto. Su inducción por exposición a una sustancia química indica que esta ha alterado el tejido embrionario de la especie estudiada. Se admite generalmente que la letalidad dominante se debe a una lesión cromosómica. si los animales tratados son hembras, la muerte del embrión también puede deberse a efectos tóxicos (Elliott et al., 1992).

iii. Nivel III: Ensayos para daño primario al ADN:

- Prueba de segregación mitótica en *Aspergillus nidulans*: Se basa en el apareamiento de supresión extragénica en una cepa auxotrófica para metionina,

*Aspergillus nidulans* FGSC 219 (biA1; methG1). Las colonias mutantes, supresoras del marcador methG1, se identifican porque han recuperado la capacidad de crecer en ausencia de metionina y en su mayoría exhiben rasgos morfológicos distintivos como pobre conidiación y pigmentación oscura o conidiación densa y bordes hialinos. Por otra parte, en cepas diploides de *Aspergillus nidulans* convenientemente marcadas se hace posible con relativa facilidad poner de manifiesto la ocurrencia de segregación somática, ocasionada por crossing-over mitótico y/o mala segregación de cromosomas (como procesos primarios o a consecuencia de mutaciones previas con efectos semidominantes sobre la viabilidad). Estas cepas son heterocigóticas para los marcadores recesivos de color de los conidios y al ocurrir alguno de los fenómenos antes mencionados, aparecen en las colonias expuestas sectores, bandas o puntos de conidiación de color diferente al resto (Scott, Dorn, Käfer, & Stafford, 1982; Käfer, Scott, & Kappas, 1986).

- Prueba de conversión génica y recombinación mitótica en *S. cerevisiae*: Es posible apreciar la recombinación mitótica entre los genes (o, más generalmente, entre un gen y su centrómero) y en el interior de ellos. en el primer caso se habla de crossing-over, generador de intercambios recíprocos, en tanto que en el segundo los intercambios, casi nunca son recíprocos, y se habla de conversión génica. el crossing-over se determina generalmente por la producción de colonias o sectores recesivos homocigotos a partir de una cepa heterocigota, mientras que la conversión génica lo es mediante la producción de inversores prototróficos en una cepa

auxotrofa heteroalelica portadora de dos alelos defectuosos distintos del mismo gen (Deiters et al., 2003).

- Prueba de mutación y recombinación mitótica en *D. melanogaster* (SMART): SMART detecta la formación de manchas en las alas de moscas expuestas durante el desarrollo; éstas pueden ser generadas por mutación puntual, pérdida no disyunción y recombinación, principalmente (Graf, Alonso-Moraga, Castro, & Díaz, 1994; Guzmán-Rincón & Graf, 1995).
- Prueba de intercambio de cromátides hermanas *in vitro* con células de mamíferos: Es una prueba a corto plazo encaminada a descubrir intercambios recíprocos de ADN entre 2 cromátides hermanas de un cromosoma de desdoblamiento. los intercambios de cromátides hermanas representan el intercambio recíproco de productos de replicación del ADN en loci aparentemente homólogos. se marca de forma diferente las cromátides hermanas, cosa que se consigue mediante la incorporación de bromodesoxiuridina (BRDU) al ADN cromosómico durante dos ciclos celulares (Sánchez et al., 2000).

iv. Nivel IV: Transformaciones celulares:

- Prueba de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones: evalúa los cambios efectuados en la concentración espermática, así como el aumento de la frecuencia espontánea de cabezas de espermatozoides morfológicamente anormales (Arencibia, Vidal, Rosario, & Delgado, 2010).

## **D. Determinación de la actividad biocida de extractos de plantas**

### 1. Actividad biocida en bacterias, hongos y levaduras

En las últimas décadas se han realizado innumerables estudios sobre la actividad antibacteriana de principios activos de plantas superiores, con la finalidad de combatir la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas (Cáceres et al. 1990; Dimayuga & García, 1991). El desarrollo de resistencia a fármacos así como los efectos secundarios indeseables de ciertos antibióticos ha llevado a la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos especialmente en las plantas medicinales (World Health Organization [WHO], 2002). La resistencia a los antibacterianos, se traduce en ineficacia de los tratamientos, generando un importante impacto en la salud humana (San Martín, Bravo, & Borie, 2005). La mayor cantidad de plantas medicinales han demostrado ser una fuente potencial de nuevos agentes antimicrobianos, así como el tratamiento eficaz de las enfermedades (Mitscher, Drake Gollopudi, & Okwute, 1987; Dimayuga & Garcia, 1991).

En respuesta a la necesidad de conseguir alternativas eficaces para el control de las infecciones bacterianas, se ha recurrido a la fitoquímica y fitofarmacológica, logrando encontrar nuevas moléculas (Ávila, Baquero, Viña & Murillo, 2006). Así, se acepta que a pesar del avance alcanzado por la síntesis química, las plantas son una valiosa fuente de sustancias activas con propiedades antibacterianas (Nascimento, Locatelli, Freitas, & Silva, 2000), apoyados en que éstas producen más de 100.000 metabolitos secundarios, muchos de los cuales pueden poseer actividad antibacteriana (Domingo & López, 2003).

Las plantas medicinales se han utilizado tradicionalmente en la medicina popular, que muestra la inhibición contra bacterias, hongos y levaduras (Hulin, Mathot, Mafart, & Dufossé, 1998). En la actualidad se conoce sólo de manera parcial, la composición química

de las sustancias antimicrobianas de las especies (Si et al., 2006). Se ha descubierto que las sustancias antimicrobianas de la mayoría de las especies son los propios aceites esenciales, mezclas de diferentes productos volátiles, entre los que se incluye alcoholes, cetonas, ésteres fenólicos, fenoles ácidos y sus ésteres; muchos de los hidrocarburos alcoholes y cetonas son terpenoides. Los aceites esenciales muestran diversas y variables actividad antibacteriana, antifúngica, antivirales, insecticidas y antioxidante (Prabuseenivasan, Jayakumar, & Ignacimuthu, 2006; Fabio, Cermelli, Fabio, Nicoletti, & Quaglio, 2007).

Los aceites esenciales y los extractos de varias especies de plantas son capaces de inhibir microorganismos patógenos relacionadas con la piel (Adam, Sivropoulou, Kokkini, Lanaras, & Arsenakis, 1998), la caries dental (Cecanho, Koo, Rosalen, & Cury, 1999), y evita el deterioro de los alimentos, incluyendo la inhibición de bacterias Gramnegativo y Grampositivo (Galli, Franzetti, & Briguglio, 1985).

Los criterios para la evaluación de la actividad antimicrobiana son muy variables y los resultados difieren entre los autores, algunas veces es difícil comparar los resultados obtenidos, cuando se trabaja con extractos de plantas con datos publicados en la literatura porque muchas variables influyen los resultados, tales como: condiciones ambientales y climáticas bajo las cuales las plantas crecen, la elección del método de extracción, la naturaleza de las cepas (si son bacterias Grampositivo o Gramnegativo) y las susceptibilidad de las cepas que se utilice (Nostro, Germano, D'Angelo, Marino, & Cannatelli, 2000).

La razón de la diferente sensibilidad entre bacterias Grampositivo y Gramnegativo podría ser atribuida a las diferencias morfológicas entre estos microorganismos, las bacterias Gramnegativo tienen una membrana externa fosfolipídica, esto hace que la pared

celular sea impermeable a los solutos lipofílicos y las porinas constituyen una barrera selectiva a los solutos hidrófilos con un límite de exclusión de aproximadamente 600 Da (Nikaido & Vaara, 1985). Las bacterias Grampositivo deben ser más susceptibles por que tiene sólo una capa de peptidoglicano exterior que no es una barrera de permeabilidad efectiva (Scherrer & Gerhardt, 1971).

La infección por patógenos fúngicos se ha vuelto más frecuente (Walsh & Groll, 1999; Fleming, Walsh, & Anaissie, 2002). Con el surgimiento del VIH, hongos patógenos oportunistas se han convertido en una causa común de morbilidad y la mortalidad (Garbino, Kolarova, Lew, Hirschel, & Rohner, 2001). Desde el primer trasplante de riñón humano en 1954, la frecuencia del trasplantes de órganos ha incrementado y el número de pacientes inmunocomprometidos ha incrementado de manera constante, con la introducción de nuevos agentes inmunosupresores, mejorando las tasas de supervivencia. La incidencia de infecciones oportunistas, incluyendo infecciones por hongos, también ha aumentado (Fishman & Rubin, 1998). Como resultado, la terapia antifúngica está jugando un papel muy importante en el cuidado de la salud y el tamizaje de plantas tradicionales en busca de nuevos antifúngicos es ahora más frecuentemente (Motsei, Lindsey, Van Staden, & Jager, 2003). Al igual que los antibacterianos, la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos se basa en gran parte, de la información la etnobotánica y etnofarmacológica.

Existen varios métodos para la investigación sobre la actividad antimicrobiana de plantas medicinales, pero no existe un método estándar ya que existen varios factores que pueden variar los resultados, tales como: la composición del medio de cultivo, los microorganismos a prueba, el volumen de inoculación, la temperatura de incubación, el método de extracción, el pH, la solubilidad de la muestra en el medio de cultivo, las

técnicas empleadas y las propiedades lipófilas de algunas muestras; estas variaciones se han minimizado trabajando en condiciones estándar. La insolubilidad en agua de aceites esenciales y extractos no polares hace que sea muy difícil de utilizar un medio acuoso en el estudio de la actividad antimicrobiana (Ríos, Recio, & Villar, 1988).

Actualmente existen varios métodos *in vitro* disponibles para detectar actividad antimicrobiana de los productos naturales, estos métodos se clasifican en tres grupos que son: los métodos de difusión en agar, bioautográficos y dilución. Los métodos y técnicas de difusión en agar y bioautográficos se conocen como métodos cualitativos; puesto que estos métodos sólo demuestran la presencia o ausencia de sustancias con actividad antimicrobiana. Por otro lado, los métodos de dilución son considerados ensayos cuantitativos, ya que determinan la concentración inhibitoria mínima (CIM) (Valgas, Machado de Souza, Smania, & Smania, 2007).

a. Método de difusión de disco en agar

Es una técnica que no requiere dispersión homogénea en el agua, el procedimiento que se utiliza en este método es una superposición de un disco que está impregnado con la muestra a ensayar, que se pone en contacto con un medio adecuado inoculado con el microorganismo a evaluar, se incuba según las necesidades del microorganismo y luego se mide el diámetro de inhibición (zona clara alrededor del disco). Este método fue diseñado originalmente para monitorear sustancias antibióticas (alcaloides y flavonoides) en extractos crudos. Al ponerse en contacto los discos con el agar, absorben agua del medio, con lo cual se disuelve la solución y empieza a difundir a través de la capa de agar. Al mismo tiempo que el antibiótico va difundiendo ocurre la multiplicación bacteriana. En este método se puede evaluar hasta seis extractos diferentes utilizando un solo microorganismo,

también se utiliza para la obtención de antibiogramas (Burlingame & Reddish, 1973; Ríos et al., 1988).

En esta técnica se pueden emplear discos de papel filtro, cilindros de porcelana o realizar agujeros en el medio de cultivo para colocar el extracto. Para realizar la evaluación antimicrobiana con esta técnica no es necesario esterilizar el extracto vegetal, en caso de existir bacterias contaminantes se desarrollan alrededor del disco y se distinguen fácilmente (Vanden-Berghe & Vlietinck, 1991).

#### b. Método de dilución

Las técnicas de dilución son todas aquellas que requieren una dispersión homogénea de la muestra en el medio cultivo en el cual crece el microorganismo. Se utilizan principalmente para determinar los valores de CIM de un extracto, aceite esencial o sustancia pura. Puede utilizarse para el tamizaje de la actividad antimicrobiana de los compuestos (Burlingame & Reddish, 1973).

En el método de dilución, la turbidez se toma como una indicación de la densidad microbiana, el extracto puede disolverse en agua, metanol ó un amortiguador de fosfato; luego se adiciona en un caldo en el cual contiene el microorganismo a prueba, se incuba de 3 - 4 h. El grado de inhibición se relaciona con la turbidez (absorbancia) del medio el cual se mide por medio de un espectrofotómetro. La dilución en medio líquido es el más complicado, pero es la técnica más precisa (Ríos et al., 1988).

Con el método de dilución en agar ofrece una distribución homogénea del compuesto en el agar y está basado en el método descrito por Mitscher y colaboradores (1972), consiste en preparar diluciones de antibiótico y mezclar con un determinado volumen de agar para obtener las concentraciones deseadas. Luego se inoculan los microorganismos a

estudiar en diferentes puntos de la placa con asa o aplicador. Se incuban las placas y se toma como punto límite la concentración mínima de antibiótico que produce inhibición completa del crecimiento (Burlingame & Reddish, 1973; Rex et al. 2000). Las ventajas de este método son su simplicidad, la posibilidad de utilizarlo en el estudio de sustancias solubles o insolubles en agua como los aceites esenciales, no es necesario el uso de extractos estériles ya que los microorganismo aeróbicos son incapaces de desarrollarse abajo del agar solidificado y la esterilidad del medio se puede comprobar al incubarlo por 24 h. Se puede evaluar hasta seis microorganismos de prueba en una placa de Petri y la actividad antimicrobiana se puede observar con la ausencia o presencia de crecimiento del microorganismo (Mitscher et al., 1972; 1987; Ríos et al., 1988).

El método establece la cantidad de muestra necesaria, la cual no debe ser mayor de 1 mg de muestra en 1 mL del medio de cultivo. Las muestras activas son reensayadas a una concentración de 0.1 mg/mL (Mitscher et al., 1972).

#### c. Método de bioautografía

El método de detección de la bioautografía es la más importante para el descubrimiento de compuestos antimicrobianos o no identificados. Se basa en la biología (efectos antibacterianos, antiprotozoarios, antitumoral, etc.) de las sustancias objetos de estudio. Debido a la complejidad de extractos de plantas, relativamente pocos estudios han tratado con el aislamiento de los antibióticos de las plantas superiores. La bioautografía es un método que hace posible localizar actividad antimicrobiana sobre un cromatograma. Esta metodología consiste en separar por cromatografía en capa fina los componentes de un extracto o sub-extracto y posteriormente “revelar” la placa cromatográfica haciendo crecer el microorganismo a prueba sobre su superficie. De esta manera, los componentes activos

de la mezcla son detectados por los halos de inhibición del crecimiento del microorganismo a prueba que ellos producen. Podría considerarse a este método como una variante de los métodos de difusión, con la diferencia de que los compuesto a analizar difunden del medio desde la fase estacionaria de una placa cromatográfica y no desde un disco de papel (Ríos et al., 1988; Valgas et al., 2007).

Se divide en tres distintos tipos: *Bioautografía directa* (Capa cromatográfica) en este método se agrega el extracto en placas de cromatografía en capa fina, se aplica el inóculo en la capa fina, se incuba y se detecta los diámetros de inhibición mediante el ensayo colorimétrico (INT). *Bioautografía indirecta* (Difusión en agar) en este método se agrega el extracto en placas de cromatografía de capa fina, las placas de TLC se cubren con agar Müller-Hinton que contiene una suspensión del microorganismo a prueba. *Bioautografía de contacto*, en este método las placas de cromatografía que contienen el extracto se pone en contacto con el agar Müller-Hinton que se encuentra inoculado por el microorganismo (por medio de un hisopo se dispersa homogéneamente el inóculo del microorganismo a prueba en la placa) (Ríos et al., 1988; Valgas et al., 2007).

#### d. Actividad antifúngica por el método de Brancato & Golding

El tamizaje de la actividad antifúngica consiste en poner de manifiesto la inhibición del crecimiento de un hongo en determinadas condiciones estándar con una concentración previamente determinada como punto de corte (entre 500-1000 mg/mL) de un extracto, fracción o compuesto obtenidos de una droga vegetal. Las pruebas se complican por ciertas características de los hongos, como dimorfismo y requerimiento de crecimiento por tiempo prolongado. El crecimiento de hongos filamentosos inoculados en medios de cultivo adecuados es inhibido por las moléculas bioactivas diluidas en el medio de agar (Solís,

Guerrero, Gattuso, & Cáceres, 2005). En plantas con actividad antifúngica, se ha sugerido que algunos compuestos denominados bioactivos, presentes en los extractos o aceites esenciales son los responsables de dicha actividad (Sukla & Tripathi, 1987). Müller-Riebau, Berger, & Yegen. (1995), encontraron que los compuestos timol y carvacrol fueron los principios activos mayoritarios encontrados en *Thymbra spicata* Pall. Ex M.Bieb. Estos productos naturales mostraron buena actividad antifúngica al compararlos con algunos fungicidas comerciales, y a una concentración de 10 µg/mL hubo una inhibición completa del micelio de los fitopatógenos: *Rizhoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Phitophthora capsici*.

También, se ha determinado que algunos de estos metabolitos secundarios son parte del repertorio de las sustancias que sirven de defensa en las plantas, entre estos se encuentran los alcaloides, terpenoides, y fenilpropanoides. Igualmente, se conoce que algunas fitoalexinas tipo flavonoides, terpénicas y sesquiterpénicas intervienen en la protección de las plantas contra los microorganismos. Las plantas superiores, ante el estrés externo inducen la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios, los cuales les confieren resistencia para el control de hongos, bacterias y virus (Marston, Maillard, & Hostettmann, 1993).

La actividad antifúngica se determina por el método de dilución en agar Sabouraud específicamente para dermatofitos según Brancato & Golding (1983), la modificación fue descrita por MacRae, Hudson, & Towers (1988), la cual consiste en usar extractos de plantas, a diferencia de la metodología original en la que se utilizan extractos químicos. El cual consiste en purificar el hongo, sembrar en un medio que permita la esporulación del microorganismo, diluir el extracto (1 mg/mL) en medio Sabouraud, abrir cuatro agujeros e

inocular  $1 \times 10^5$  esporas de hongos miceliares en el medio que contiene el extracto, se inocula por cuadruplicado y se incuba a  $27^\circ\text{C}$  durante 21 días, luego se mide el diámetro de las colonias y compara contra el control negativo (Cáceres et al, 1998).

## 2. Actividad contra *Artemia salina*

El camarón salino (*A. salina*) es un crustáceo perteneciente a la subclase Branchiopoda, orden Anostraca. Este se encuentra distribuido en todo el mundo en rangos de salinidad altos (Carballo et al., 2005).

Esta prueba fue propuesta por Michael, Thompson, & Abramovitz (1956), y ha sido utilizada para la detección de sustancias bioactivas en extractos de plantas (Meyer et al., 1982) e incluso se propuso como una prueba estándar para evaluar toxicidad (Vanhaecke, Personne, Claus, & Sorgeloos, 1981). La disponibilidad de los huevos, la facilidad de eclosión, el rápido crecimiento de los nauplios, la rapidez para realizar el ensayo, su bajo costo, empleo de poca cantidad de muestra y la relativa facilidad de mantenerlos en condiciones de laboratorio hace que sea una prueba simple y efectiva para estudios de toxicidad en animales (Mawardi et al., 1992; Oliva, Gallucci, Zygadlo, & Demo, 2007). La prueba de *A. salina* se realiza exponiendo los nauplios del camarón salino a los compuestos químicos en medio salino, y se evalúa la letalidad a las 24 h.

La prueba de *A. salina* es útil para la evaluación preliminar de toxicidad debido a que el camarón salino es muy sensible a una variedad de sustancias químicas (Solís, Wright, Anderson, Gupta, & Phillipson, 1993), y se ha utilizado para la detección de toxinas de hongos (Harwing & Scott, 1971), toxicidad de extractos vegetales (McLaughlin, Chang, & Smith, 1991), toxicidad de metales pesados (Martínez, Del Ramo, Torreblanca, & Díaz-Mayans, 1998), detección de toxinas de cianobacterias (Jaki, Orjala, Bürji, &

Sticher, 1999), y pruebas de citotoxicidad de materiales dentales (Pelka, Sanzl, Distler, & Petschelt, 2000).

Un gran número de estudios ha demostrado la utilidad de *A. salina* para tamizar la actividad citotóxica, plaguicida (Barahona & Sánchez-Fortún, 1999), insecticida (Oberlies, Rogers, Martin, & McLaughlin, 1998), anti – malaria (Pérez, Díaz, & Medina, 1997), y anti-*Trypanosoma cruzi* (Zani et al., 1995). La prueba de *A. salina* también es utilizada como tamizaje preliminar en la búsqueda de agentes anticancerígenos, dado que se ha demostrado que existe una directa relación entre los valores de la  $CL_{50}$  calculada y las pruebas anticancerígenas realizadas utilizando sistemas de cultivo *in vitro* (Ticona, Nieva, Irahola, & Gimenez, 1998). También se ha demostrado que existe una correlación muy buena entre  $CL_{50}$  de extractos de plantas en nauplios de *A. salina* y la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de los mismos extractos, administrados por vía oral a ratones (Lagarto, Silva, Guerra, & Iglesias, 2001). La toxicidad observada en camarón salino coincide con la toxicidad observada en células de mamífero en muchos de los casos. Sin embargo, no hay una correlación en el grado de toxicidad entre estas dos pruebas (Franssen, Smeijsters, Berger, & Medinilla, 1997).

### 3. Actividad contra larvas de insectos

Los mosquitos constituyen un grupo de insectos de gran importancia, debido a que muchas de sus especies, son vectores de enfermedades humanas importantes en salud pública como la malaria, el dengue, la filariasis, fiebre amarilla, y la encefalitis japonesa (Das & Ansari, 2003; Pacheco, 2004). Las especies de mosquito *A. aegypti* y *A. albimanus* (Diptera: Culicidae), son insectos de distribución cosmopolita. *A. aegypti*, es el principal vector del virus que causan el dengue, entre otras (Service, 1983; Yang et al., 2009). *A.*

*albimanus* es uno de los principales vectores de malaria en América Latina (Gutiérrez et al., 2009; Loaiza, Scott, Bermingham, Rovira, & Conn, 2010). La mejor forma de control de la transmisión de estas enfermedades es el control de los vectores utilizando diversos métodos, como el uso de insecticidas organofosforados (Malavige, Fernando, Fernando, & Seneviratne, 2004). El temefos es utilizado por los programas de control larvario en muchos países de América Latina, constituyendo un elemento de riesgo en salud pública debido a su toxicidad en humanos y su moderado impacto en el ambiente (Iannacone & Alvariño, 1998). En respuesta a esta problemática se ha agudizado la búsqueda de alternativas menos riesgosas y con bajo costo económico y ambiental. El empleo de productos derivados de plantas como extractos y aceites esenciales pueden ser una alternativa para el control de larvas de mosquitos ya que es una opción natural, biodegradable, posee baja toxicidad para el humano, y además es considerada segura para el medio ambiente (Bansal, Singh, Sharma, & Sherwani, 2011; Iannacone, Alvariño, & Mansilla, 2002; Pacheco, 2004). El uso productos vegetales ha sido utilizados para el control de insectos desde tiempo inmemoriales. Muchos investigadores han reportado la eficacia de los extractos vegetales y aceites esenciales como larvicidas y repelentes de mosquitos, sin que ello entrañe riesgos de toxicidad para los seres humanos (Amer & Mehlhorn, 2006; Rahuman et al., 2009), tal es así que se continúan investigando como repelentes de mosquitos adultos (Yang, Lee, Lee, Lee, Ahn, 2004), y como intoxicantes e inhibidores del crecimiento de larvas (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 1999; Iannacone et al., 2002). Hoy en día son reconocidos varios fitoquímicos botánicos como potentes insecticidas alternativos para reemplazar a los insecticidas sintéticos en los programas de control de mosquitos, debido a sus excelentes propiedades como larvicidas,

ovicida, adulticida y repelente (Borah, Kalita, Kar, & Talukdar, 2010; Rahuman et al., 2009).

La familia *Euphorbiaceae* es una familia rica en alcaloides y terpenoides, compuestos que pueden tener actividad biocida contra larvas de insectos. Como es el caso de *Acalypha indica*, una *Euphorbiaceae* que ha sido estudiada como un insecticida botánico efectivo contra mosquitos (Govindarajan, Jebanesan, Pushpanathan, & Samidurai, 2008).

#### 4. Bioensayo de *Allium cepa*

Kumari y colaboradores (2003) señalan que las raíces de plantas superiores, por ser sistemas no fotosintéticos y libres de cloroplastos, presentan reacciones similares a las de los tejidos y células de los vertebrados, por lo que son tan válidas como los grupos celulares de los mamíferos para detectar citotoxicidad basal. En esta misma línea argumental, subraya que los meristemos radicales de cebolla pueden ser empleados, además, para investigar la genotoxicidad mediante análisis microscópicos de las aberraciones celulares durante la división mitótica.

Las plantas superiores presentan características que las hacen excelentes modelos genéticos para evaluar contaminantes ambientales, siendo frecuentemente utilizadas en estudios de monitoreo. Sin embargo, esta característica no es sólo debido a la sensibilidad para detectar sustancias mutágenas en diferentes entornos, sino también a la posibilidad de evaluar varias manifestaciones genéticas, que van desde mutaciones puntuales como aberraciones cromosómicas (CA de sus siglas en inglés) (Grant, 1999), daños en el cromosoma y aneuploidias (Houk, 1992) en células de diferentes órganos y tejidos, tales como hojas, raíces y polen (Grant, 1994)

Existen varias especies de plantas que son utilizadas como modelos para evaluación de efectos citotóxicos y genotóxicos entre ellas *A. cepa*, *Crepis capillaris* L.Wallr., *Hordeum vulgare* L., *Pisum sativum* L., *Tradescantia* L., *Vicia faba* L. y *Zea may* L. (Grant, 1982). Además, aún entre estas especies, *A. cepa* ha sido considerada adecuada ya que posee cromosomas de gran tamaño y en número reducido ( $2n=16$ ) (Fiskesjö, 1988) lo que la hace una especie manejable y reproducible. *A. cepa* se ha utilizado como un excelente modelo genético para detectar mutágenos ambientales y frecuentemente utilizado en estudios de monitoreo ambiental, evaluar daños de ADN, aberraciones cromosómicas y alteraciones en el ciclo mitótico (Fiskesjö, 1985; Grant, 1994; Leme & Marin-Morales, 2009; Casimiro, Christofolletti & Marin-Morales 2009). Además está caracterizada como una prueba de bajo costo y presenta resultados en tiempos cortos comparados con otras pruebas a corto plazo que requieren preparación previa de las muestras (Leme & Marin-Morales, 2009).

Este bioensayo se ha utilizado para detectar diferentes contaminantes ambientales entre los que se pueden mencionar metales pesados, pesticidas, hidrocarburos aromáticos, desechos de industrias textiles (Barbério, Barros, Voltolini & Mello, 2009), productos para desinfección de agua, y otros agentes (Leme & Marin-Morales, 2009; Herrero, Pérez., Fernández, Carvajal, & Peropadre, 2012).

Se ha utilizado para evaluar el efecto de extractos de plantas utilizadas en medicina tradicional determinando índice mitótico y aberraciones cromosómicas (Akintonwa, Awodelea, Afolayana, & Cokerb, 2009) Así como efectos mitodepresivos y mutagénicos en la división celular y huso mitótico inducido por algunos extractos acuosos de plantas medicinales (Akinboro & Bakare, 2007) denotando inhibición del crecimiento de la raíz,

disminución del índice mitótico y el incremento de de aberraciones cromosómicas dependientes de la concentración. (Akinboro & Bakare, 2007; Akintonwa et al., 2009; Oyendare, Bakare, & Akinboro, 2009).

Los niveles altos de metales pesados en plantas medicinales pueden ser dañinos para la salud de las personas que los utilizan, se ha reportado altos niveles de metales pesados (Fe, Mn, Cu, Pb y Zn) y algunos macronutrientes (Na, K, Mg y Ca) que son variables en los extractos de plantas de uso medicinal (Al-Moaruf, Muibat, Asiata, Isiaka, & Nureni, 2004) Se ha determinado que existen cambios macroscópicos relacionados al crecimiento apical (reducción de ápices) y cambios microscópicos relacionados a distorsiones en el ciclo celular (Rank, & Nielsen, 1998) dependientes de las concentraciones de Cu, Pb, Zn. (Aramba-Ic, Bjeli, & Subakov, 1994). Oyendare y colaboradores (2009) reportan la inducción de células binucleadas por extractos acuosos de plantas medicinales que dependen de las concentraciones utilizadas.

## **E. Etnobotánica**

En base a estudios botánicos y al uso popular de plantas de uso fitoterapéutico, se han seleccionado tres plantas de la familia *Euphorbiaceae* que se encuentran en creciente demanda por las propiedades medicinales que poseen.

### 1. *Euphorbia lancifolia* Schltdl.

#### a. Nombre común:

Besmut, ixbut, sapillo (Guatemala); hierba lechera (Costa Rica y México); isbut (Cuba) (Gupta, 2008).

b. Descripción botánica:

Planta silvestre lechosa como sucede en casi todas las Euforbiáceas. Hierba subtrepadora o rastrera de tallos delgados, cilíndricos, algo carnosos, lisos y articulados de color verde pálido, hojas alternas romboideo-lanceoladas, anchas en la base y con extremidades agudas, 5-9 cm de largo por 1.5-2 cm de ancho en la base, con las nervaduras laterales invisibles; flores pequeñas y blanquizcas, con el cáliz de 4 segmentos y el ovario beloso (Deleón, 1995).

c. Uso en medicina tradicional:

En Centro América y el Caribe, la infusión o cocción de la hoja goza de gran reputación para favorecer la lactancia de las madres, combatir la impotencia sexual, fiebre puerperal y cólico estomacal. Tópicamente se usa la decocción de la planta completa en baños para curar llagas y dolor de cuerpo. A toda la planta se le atribuyen propiedades galactogoga, antiséptica y tónico estimulante (Gupta, 2008; Rosengarten, 1982). En Costa Rica es utilizada para aliviar los síntomas provocados por la menopausia (Doyle et al., 2009).

d. Actividad farmacológica y toxicidad:

La tintura de las hojas tiene actividad contra bacterias (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. flexneri* y *S. typhi*), levaduras (*C. albicans* y *C. neoformans*) y hongos dermatofitos (*E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum*) con una dosis entre 1-10 mg/mL (Gupta, 2008). Durante 1949, se realizó pruebas de las propiedades insecticidas de 78 especies de plantas tropicales de América, se recolectó las raíces, tallos, hojas, flores y semillas y se analizaron en la Estación Agrícola Experimental, Mayagüez, en Puerto Rico para determinar la toxicidad de los materiales a los insectos. Cinco fueron encontradas

altamente tóxicas, 30 especies parcialmente tóxicos, mientras que 43 especies, incluyendo ixbut resultaron ser no tóxicos para los insectos (Rosengarten, 1982). Standley y Steyermark, (1949) reportaron causas de muerte por ixbut en ganado y caballos que consumieron esta planta, y esto puede ser el resultado de las propiedades inherentes de la semilla ó por la confusión de ixbut con otra planta, incluso con otra especie de *Euphorbia*. Hasta el momento no se ha informado de casos de toxicidad de *E. lancifolia* en humanos, cabe de destacar que solo debe utilizarse las hojas y ramillas, no las semillas, que al parecer no es utilizado por la población nativa (Dressler, 1961; Rosengart, 1982,).

## 2. *Cnidoscolus aconitifolius* L.M.Jhonst.

### a. Nombre común:

Chaya, chanyo, copapayo, chichicaste (Webster, 1975).

### b. Descripción botánica:

Es un arbusto o árbol pequeño, generalmente de 3 a 5m de altura, con un tronco grueso y de color pálido, pecíolos de 10 a 20 cm de largo y algunas veces más cortos, usualmente glabrosos; hojas de forma muy variada, profundamente lobadas de 3 a 7, cordada a la base, bastante gruesas cuando están frescas; flores blancas de sépalos glabrados o diminutamente puberulentos, blancos o verdosos, usualmente de menos de 1 cm de largo. (Bressani, 1993; Carbajal, Parra, & Rico, 1998).

La chaya pertenece a la sección *Calyptosolen* del género *Cnidoscolus*, el cual está cercanamente relacionado al mejor conocido género *Manihot*. Los dos géneros se encuentran dentro de la tribu *Manihoteae* de la subfamilia *Crotonoideae* de la *Euphorbiaceae* (Webster, 1975). *Cnidoscolus* ha sido comúnmente agrupado con *Jatropha*, es fácilmente separado del anterior por sus pelos urticantes, glándulas peciolares, y por

tener una sola envoltura floral blanca (McVaugh, 1944). Un estudio posterior de la anatomía vascular peciolar y la morfología del polen confirma firmemente esta separación (Miller & Webster, 1962). El potencial nutricional de los diferentes tipos de chaya semidomesticada, en promedio de varios cultivares, es de 9.2% de cenizas, 31.2% de proteínas, 7.9% de humedad; 34.7 de HCN, 21.5 de Fe, 4.3 Mn, 880 de Ca, 7.2 Zn, 1.3 Cu y 484 de Mg por cada 100 g (Cifuentes, Pöll, Bressani, & Yurrita, 2010).

c. Uso en medicina tradicional:

La chaya ha sido cultivada desde la época prehispánica; Se usaba como hasta hoy en cercos vivos, como planta comestible, medicinal y ornamental por más que 10 grupos mayas y también otros grupos mexicanos y mesoamericanos (Ross-Ibarra & Molina-Cruz, 2002). La raíz gruesa, de color amarillento, también se comía; se la llama chayotestle, chinchayote o chayocamote. El fruto y aún las hojas tiernas y jóvenes se cuecen y se consumen como la espinaca u otras hierbas. Aunque su uso es bastante extenso, nunca se la encuentra en los mercados. Tienen un excelente contenido de carotenos y proteína (Bressani, 1993; Molina-Cruz, Curley, & Bressani, 1997). Normalmente se encuentra cultivada en huertos familiares o jardines, y a menudo está sembrada junto a otros cultivos en una milpa o campo de cultivos. La hoja, y a veces el pecíolo y los brotes, son cosechadas y cocidas para varios tipos de guisado o para uso medicinal (Ross-Ibarra & Molina-Cruz 2002). En el sudoeste de Nigeria se come en sopas (Azeez, Oyagbemi, Oyeyemi, & Odetola, 2010). En Yucatán, se utiliza en el tratamiento del reumatismo consiste en restregar la planta localmente. Asimismo, se le utiliza en dolores musculares y se le atribuyen propiedades anticonceptivas, se usa para el tratamiento de la gingivitis, y enfermedades venéreas (Argueta, Cano-Asseleih, & Rodarte, 1994; Cáceres, 1996). En

Morelos y Tabasco el principal uso medicinal que se le da a esta planta es para el dolor de riñones. Como tratamiento se preparan las hojas en cocción y se administra en forma oral. De igual manera se le emplea en caso de diabetes y convalecencia y en Hidalgo cuando hay ausencia de la leche en para lactancia materna humana. De manera externa se aplica con el látex para reventar nacidos, en Tabasco. Asimismo, se utiliza para tratar el colesterol en la sangre y como medio para combatir el alcoholismo. Se le atribuyen propiedades laxantes y diuréticas (Rojas & Sander, 1989). La hiperglucemia provocada, por la diabetes mellitus, produce un mayor estrés oxidativo, provocando una disminución de varios parámetro hemáticos, la utilización *C. aconitifolius* mejora esta disminución (Azeez et al., 2010).

d. Actividad farmacológica y toxicidad:

Se ha demostrado que contienen alcaloides, flavonoides, triterpenos, fenoles (taninos), saponinas (triterpenos), glucósidos cardíacos y glucósidos cianogénicos (Argueta et al., 1994; Kuti, & Konoru, 2006; Oyagbemi, Odetola, & Azeez, 2011). Hay estudios que demuestran que poseen actividad antioxidante. Sánchez y colaboradores (2001), evaluaron la actividad biocida de *C. aconitifolius* contra *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, donde obtuvieron halos de inhibición de 5 mm en el caso de *P. aeruginosa* y *C. albicans*. Estudios recientes han demostrado actividad inhibitoria de  $\beta$ -glucosidasa, lo que significa que puede tener efectos antivirales, antibacteriano, antimetastático e inmunoestimulador (Miller & Chamberlin, 1990; Sánchez, Garcia, May, & Peña, 2001; Wong et al., 1995). En los resultados de algunos estudios indican que la hoja de la planta *C. aconitifolius* var. *mansa* puede ser utilizada con los fines terapéuticos ya que los efectos tóxicos que se observan son leves y reversibles en el tiempo (Miller & Webster, 1962; Torrico, Gabay, & Suárez, 2003).

e. Variedades de la especie:

La Chaya es una planta nativa de Mesoamérica aptada para crecer en ambientes húmedos y secos, existen cuatro variedades silvestres: Estrella, Mansa, Picuda y Plegada (Molina-Cruz, Cifuentes, Arias & Bressani, 2000). Las variedades 'Estrella' y "Picuda", se ajustan exactamente a la descripción de McVaugh de la especie (McVaugh 1944), mientras que la variedades 'Redonda' y 'Plegada', son casi desconocida del taxón, y se ha descrito brevemente como dos variedades distintas (chaya dormilona y chaya golondrina) por Salazar (1991).

A continuación se describe sus características:

- ***Cnidoscolus aconitifolius* var. *estrella***: Arbusto pequeño de hasta 6 m de alto. Presenta tallos de madera suave y quebradiza que al cortar emanan un látex (savia) de color blanco. Las hojas son simples, alternas, con peciolo largos que tienen 1 - 2 glándulas esféricas grandes en la base acorazonada de la lámina foliar tri- o pentalobulada. Los ápices de los lóbulos son largamente acuminados y los bordes gruesamente dentados. A veces con pequeños pelos urticantes, pero generalmente ausentes. Las pequeñas flores blancas unisexuales se encuentran en inflorescencias largamente pedunculadas. Las flores femeninas apétalas, con brácteas blancas nacen en el centro de las bifurcaciones de la inflorescencia cimosa. Los frutos son cápsulas globosas de verde brillante con los carpelos bien marcados y semillas elipsoides de color café oscuro. Pocas flores masculinas se encontraron en las ramificaciones cortas de la cima, generalmente escasas flores y casi no presenta frutos (Cifuentes et al., 2010; Ross-Ibarra & Molina-Cruz, 2002).

• ***Cnidoscolus aconitifolius* var. *mansa***: La planta es un arbusto herbáceo de aproximadamente 2 - 4 m de alto presenta tallos semileñosos de madera suave y quebradiza que cuando se cortan emanan un látex (savia) de color blanco. Las hojas son simples, alternas de poca pronunciación trilobada, peciolo largo con dos glándulas ovoides por la base del limbo; los lóbulos son anchos con bordes enteros u ondulado-dentado y ápices auminados. La base del limbo es truncado- acorazonado. Las láminas de las hojas de “Mansa” presentan la mayor área foliar en comparación con el resto de variedades. Las escasas inflorescencias son cimas pequeñas en las cuales se observa únicamente flores femeninas de las cuales no se desarrollan frutos (Cifuentes et al., 2010; Salazar, 1991)

#### IV. JUSTIFICACION

Las plantas medicinales han sido utilizadas empíricamente durante siglos para la prevención y tratamiento de enfermedades; en la actualidad el interés en ellas continúa. Debido a que su complejidad química es una fuente valiosa de principios activos, y modelo para el desarrollo y síntesis de nuevos productos farmacéuticos y agroindustriales.

La falta de estudios que proporcionen suficiente información científica sobre el uso y la seguridad de las plantas medicinales, ha detenido la evolución del uso tradicional en la medicina moderna; y desestima el potencial biológico de los compuestos que le proporcionan propiedades terapéuticas y tóxicas. Se estima que el grado de toxicidad de una planta puede ser una característica importante a estudiar, por tal motivo, se estudió tres plantas medicinales de la región, pertenecientes a la familia *Euphorbiaceae*, conocida por el alto potencial tóxico de varias de sus especies. Apoyados en los conocimientos populares se seleccionó a *E. lancifolia* y dos variedades de *C. aconitifolius*, buscando establecer el efecto tóxico *in vitro*, al evaluar la acción biocida, citotóxica y genotóxica de sus extractos etanólicos, con el fin de aportar a futuras investigaciones, datos e información de su toxicidad, que favorezcan el desarrollo de alternativas del uso de plantas y sus derivados para beneficio del ser humano.

## V. OBJETIVOS

### A. General

Establecer el efecto tóxico *in vitro* de los extractos de tres especies de la familia *Euphorbiaceae* usadas en Guatemala como medicina natural.

### B. Específicos

1. Establecer el porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos de *C. aconitifolius* var. *estrella*, *C. aconitifolius* var. *mansa* y *E. lancifolia*.
2. Investigar la actividad biocida *in vitro* de los extractos de las tres especies en estudio.
3. Determinar la CIM de los extractos activos contra bacterias, levaduras y hongos miceliares.
4. Establecer la toxicidad aguda de los extractos de las tres plantas en estudio contra nauplios de *A. salina*.
5. Determinar la actividad larvicida de los extractos de las tres plantas de la familia *Euphorbiaceae* en larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus*.
6. Establecer la citotoxicidad y genotoxicidad de los extractos de tres plantas de la familia *Euphorbiaceae* por medio del bioensayo *A. cepa*.

## **VI. HIPOTESIS**

Al menos uno de los extractos etanólicos de tres plantas de la familia *Euphorbiaceae* presenta actividad en alguno de los bioensayos a realizarse.

## VII. MATERIALES Y METODOS

### A. Universo

Plantas de la familia *Euphorbiaceae* de consumo humano.

### B. Población

Tres plantas medicinales de la familia *Euphorbiaceae* utilizadas por la población guatemalteca.

### C. Muestra

Extractos etanólicos de tres plantas de la familia *Euphorbiaceae*: *E. lancifolia* *C. aconitifolius* var. *mansa* y *C. aconitifolius* var. *estrella*.

### D. Recursos

#### 1. Humanos:

##### a. Investigadores:

- Br. María Alejandra Arriola Navas.
- Br. Jorge Luis Gutiérrez Montúfar.
- Br. Elvia Verónica Soto López.
- Br. Ana Asucena Yoc Canel.

##### b. Asesores:

- Lic. Ana Margarita Paz.
- Lic. María Eugenia Paredes.

##### c. Revisor

- Lic. Armando Cáceres.

## 2. Físicos:

### a. Equipo:

- Agitador magnético
- Agitador tipo vórtex
- Aparato de percolación
- Autoclave
- Balanza semianalítica
- Bomba de oxígeno para pecera
- Campana microbiológica de flujo laminar
- Congelador a -20°C
- Desecadora
- Estereoscopio
- Estufa
- Incinerador
- Incubadora a 26 y 37 +/- 2°C
- Lámpara de luz blanca
- Lámpara de luz UV
- Mechero
- Microscopio óptico
- Percolador de vidrio o acero inoxidable
- Pipetas automáticas de 10– 100, 100 – 1000 µL.
- Refrigeradora

- Rotavapor
- Sistema de enfriamiento
- Sonicador
- Termómetro

b. Materiales:

- Aceite de inmersión
- Agujas de disección
- Algodón
- Asas bacteriológicas
- Balón de 1000, 500 mL
- Beakers de 500, 250 y 100 mL
- Bolsas resellables plásticas
- Cajas de Petri desechables de 100x15 mm sometidas a proceso de radiación UV.
- Cámara de Neubauer
- Campanillas de Durham
- Cilindros de aluminio
- Cinta testigo
- Cubetas plásticas
- Cuchillo y navajas
- Discos estériles para aplicación de extractos
- Embudo
- Erlenmeyers de 1000 , 500 y 250 mL

- Gelatina para fijación
- Gotero
- Gradillas
- Guantes de látex
- Guantes de nitrilo
- Hisopos estériles
- Hojas de afeitar o bisturí
- Jarra para anaerobiosis
- Manguera de hule
- Mascarilla
- Microplaca de fondo plano de 20 pozos
- Microplaca de fondo plano de 96 pozos
- Papel aluminio
- Papel para empapelar tipo craft
- Papel filtro Whatman No.1
- Papel limpia lentes
- Papel parafilm
- Pinzas
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL
- Pipeteador
- Plantillas para siembra de bacterias y hongos
- Porta objetos y cubreobjetos

- Porta tips
- Probetas de 100, 250 y 500 mL
- Puntas amarillas de 100 y azules 1000  $\mu$ L
- Tubos de ensayo con tapón de 15 mL
- Tubos de ensayo de 7 mL de fondo redondo
- Tubos ependorf
- Tubos de ensayo de 150 mL de fondo redondo
- Tubos de ensayo de 70 mL de fondo redondo
- Varillas de vidrio
- Vidrios de reloj

c. Reactivos:

- Agar base columbia
- Agar Müeller Hinton
- Agar sabouraud
- Agar-agar
- Agua de chorro
- Agua destilada estéril
- Alcohol acetona
- Amoxicilina acido clavulánico 1 g
- Caldo Tripticasa soya
- Carbol-fucsina
- Cefotaxima 1 g

- Cloruro de Sodio (NaCl)
- Cristal violeta
- Dextrosa
- Discos de ácido nalidíxico comerciales de 30 µg
- Etanol al 95, 70 y 50%
- Fosfato diácido de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- Fosforotionato de o, o, o, o'-tetrametil-o, o'-tio-di-p-fenileno (temefos)
- Furosemida 40 mg
- Glicerol
- Herbicida Paraquat®
- Hidróxido de potasio (KOH)
- Hipoclorito de sodio al 5%
- Hipurato de sodio
- Isovitalex®
- Orceina acética
- Peptona
- Peróxido de sodio al 30%
- Prueba de la oxidasa Bactident®
- Sal de mar
- Sangre de carnero
- Sobres para crear sistema micro aerofilico (GasPak™ EZ Anaerobe Container System) y (Campy-pak BBL™).

- Sulfato de sodio (NaSO<sub>4</sub>)

d. Biológicos:

- i. Bacterias procedentes del cepario del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC (*Bacillus subtilis* ATCC™ 6051, *Staphylococcus aureus* ATCC™ 25923, *Escherichia coli* ATCC™ 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC™ 27853, *Salmonella typhi* ATCC™ 14028, *Mycobacterium smegmatis* ATCC™ 607, *Campylobacter jejuni* ATCC™ 33291)
- ii. Bulbos de cebolla blanca de 1.5 cm de diámetro
- iii. Cepas de hongos filamentosos y levaduras procedentes cepario del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC (*Microsporium gypseum* ATCC™ 1152000, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum* ATCC™ 1132000, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC™ 9972, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* ATCC™ 9029, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida albicans* ATCC™ 10231 y *Candida tropicalis* ATCC™ 1312000). Los microorganismos que nos son ATCC™ provienen de aislamientos propios del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- iv. Huevos de *A. salina*
- v. Larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus* procedentes del Programa de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

e. Otros

- Marcador indeleble
- Masking tape

- Impresora
- Cinta adhesiva
- Computadora
- Cuaderno de control de investigación
- Papel bond tamaño carta
- Programa de computadora Finney (DOS)
- Programas de Microsoft office
- Regla graduada
- Tinta para impresora

### 3. Institucionales

- a. Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
- b. Herbario BIGU, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
- c. Laboratorio de Investigación en productos naturales (LIPRONAT), Departamento de Farmacología y Fisiología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
- d. Asociación de Servicios Comunitarios de Salud (ASECSA) Chimaltenango.
- e. Universidad del Valle de Guatemala.
- f. Programa de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.
- g. Laboratorio de productos naturales Farmaya.

## **E. Metodología**

### 1. Recolección de las plantas:

Los ejemplares de *E. lancifolia* fueron proporcionados por la Asociación de Servicios Comunitarios de Salud (ASECSA) ubicada en el departamento de Chimaltenango en donde es utilizada para su comercialización. Las variedades de *C. aconitifolius* provinieron de granjas de la Universidad del Valle de Guatemala, ubicadas en Escuintla donde se reproducen para su estudio. Las muestras vegetales se secaron a la sombra a temperaturas entre 25 y 30°C.

La caracterización de dichos ejemplares se llevó a cabo en el herbario BIGU, de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

### 2. Preparación de extractos

#### a. Extractos etanólicos

Los extractos etanólicos al 95% se obtuvieron por extracción continua con etanol por percolación y concentración a temperaturas y presiones altas en rotavapor como se describe a continuación:

- i. Se trituró las hojas de la planta ya seca para obtener partes iguales y se pesó aproximadamente 200 g.
- ii. En un percolador previamente limpio y seco, se colocó un algodón en la parte inferior y papel filtro cortado de acuerdo al diámetro del percolador.
- iii. En la salida con rosca del percolador se colocó una manguera de hule (gruesa) de aproximadamente 1 cm de diámetro y 10 cm de largo. Se colocó en el extremo libre de la manguera, una pinza o llave de paso.

- iv. Se colocó la materia seca vegetal previamente pesada y se agregó etanol al 95% hasta llegar a una pulgada sobre el nivel de materia vegetal del extremo superior del percolador, presionando a manera de usar la mayor cantidad posible.
- v. Se colocó sobre la materia seca vegetal un círculo de papel filtro de aproximadamente 10 cm de diámetro, y se colocó sobre este tapones de hule a manera que sirvan de contrapeso.
- vi. Se dejó reposar por 48 h para llevar a cabo la extracción, se abrió la llave de paso liberándose el extracto a una velocidad adecuada y se depositó en un recipiente. Durante 4 días consecutivos se realizó el mismo procedimiento, disminuyendo el tiempo de reposo a 24 h.
- vii. Obtenido el extracto etanólico (menstruo) se concentró a sequedad en un rotavapor.
- viii. Luego se colocó el extracto etanólico en una desecadora que contiene cloruro de calcio para su solidificación.

### 3. Actividad biocida contra bacterias, hongos y levaduras

#### a. Actividad antibiótica de los extractos etanólicos

Se realizó el ensayo de la actividad antimicrobiana por el método de dilución en agar descrito por Mitscher y colaboradores (1972), de la siguiente manera:

A 9 mL de agar Müeller Hinton se agregó 1 mL del extracto de cada planta (dilución 1:10), se vertió en una caja de Petri para su confrontación microbiana. Para comprobar que el medio se encontraba libre de contaminación, se incubó a 35°C durante 24 h, y se observó

el crecimiento bacteriano, las cajas libres de contaminación se almacenaron a 4°C en bolsas plásticas hasta su utilización.

- i. Demostración de la actividad antibacteriana: Se purificó las cepas *Bacillus subtilis* ATCC™ 6051, *Staphylococcus aureus* ATCC™ 25923, *Escherichia coli* ATCC™ 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC™ 27853, *Salmonella typhi* ATCC™ 14028, *Mycobacterium smegmatis* ATCC™ 607 en cajas de agar de Müeller Hinton, luego de que se comprobó su pureza. Se tomó una asada y se inoculó en 5 mL de caldo tripticasa soya, se incubó a 35°C por 24 h, se tomó 0.5 mL de este caldo y se agregó en 4.5 mL de solución salina estéril al 0.85% para una concentración de 1 mg/mL. Se tomó con un asa en argolla una porción de cada uno de los microorganismos y se inoculó en las cajas con extracto crudo, se siguió el patrón de 8 partes iguales con una zona clara en el centro de la caja, se dejó reposar durante 5 – 10 min. y se incubó a 35°C por 24 h. Se inocularon dos estrías de la misma bacteria por caja. Todos los tratamientos se realizaron por quintuplicado. Se utilizó etanol al 50% como control negativo y cefotaxima a una concentración de 0.1 mg/mL como control positivo, a los cuales se les dio el mismo tratamiento que a los extractos.
- ii. Interpretación de los resultados: Se observó la aparición de un crecimiento homogéneo en las zonas de inoculación y se interpreto de la siguiente manera:
  - Si hubo crecimiento homogéneo a lo largo del inocular, actividad negativa.
  - Si hubo alteraciones morfológicas, actividad parcial.

- Si hubo crecimiento de algunas colonias a lo largo del inóculo, resistencia.
- Presencia de microorganismos fuera del área de inoculación, contaminación.
- Si no hubo crecimiento, actividad positiva.

Para la determinación de la CIM se utilizó el mismo procedimiento con diluciones de extracto 1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL; la interpretación de los resultados fue la misma que se aplicó en el procedimiento de tamizaje.

- iii. Validación: Si no se observó crecimiento en el control negativo (etanol 50%) la prueba no es válida y hay que repetirla de nuevo. Si no se observó inhibición en el control positivo (cefotaxima 0.1 mg/mL) de todas las bacterias, la prueba no es válida y hay que repetirla de nuevo.

b. Demostración de la actividad antilevadura

Se prepararon tubos con 9.0 mL de agar Müeller Hinton, se esterilizó a 121°C durante 15 min, se dejó enfriar a 50°C y se agregó 1.0 mL de extracto de planta a probar (Dilución 1:10) se agitó. La concentración final que se obtiene es de 1 mg/mL. Se vertió en cajas de Petri estériles, se dejó solidificar, y se incubó a 36°C por 24 h para chequear esterilidad. Se guardó en refrigeración hasta el momento de su uso.

Se sembraron cepas ATCC™ (*C. albicans* ATCC™ 10231, *C. tropicalis* ATCC™ 1312000, *C. glabrata* y *C. krusei*) en cajas de agar Sabouraud y se incubaron a 36°C por 48 h, se tomó un inóculo fresco, se sembró en 5 mL de caldo tripticasa soya y se incubó por 48 h. Se tomó con una pipeta estéril 0.5 mL de dicha suspensión y se agregó en 4.5 mL de solución salina estéril (dilución 1:10).

Se inoculó con asa la suspensión de levaduras en cada sección de la plantilla, se incubó por 36°C durante 48 h. Se hicieron cuatro estrías por caja. Para el control negativo, se sembraron por estrías las levaduras en una caja con agar sabouraud con etanol al 50%. Todo se realizó por quintuplicado.

- i. Interpretación de los resultados: Actividad negativa: si hubo crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo. Actividad positiva: no hubo crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo. Contaminación: si hubo presencia de microorganismos fuera de la inoculación. Todas las estrías de la misma levadura debieron tener el mismo patrón.
  - ii. Validación: Si no se observó crecimiento en el control negativo (etanol 50%) la prueba no es válida y hay que repetirla de nuevo.
- c. Demostración de la actividad antifúngica

La actividad contra hongos filamentosos se determinó por el método de Brancato & Golding (1983), modificado por MacRae y colaboradores (1988). Que consistió en purificar el hongo en agar sabouraud, según sea el crecimiento de cada hongo, luego se inoculó en medio Takashio (sabouraud modificado para producción de esporas), estos se incubaron a 27°C por 21 días. Se colectaron las esporas agregando 2 mL de agua destilada estéril desprendiendo el hongo con la ayuda de una varilla. Se procedió a contarlas en cámara de Neubauer hasta estandarizar una suspensión de 100 esporas/mL lo que es aproximadamente 10 esporas/ cuadrante, ya obtenidas se procedió a guardar la suspensión en viales estériles a 4°C. Se preparó cuatro cajas con 13.5 mL de agar sabouraud al que se agregaron 1.5 mL del extracto a probar (dilución 1:10), la concentración final que se obtuvo fue de 1 mg/mL. Las cajas se incubaron a 36°C durante 24 h para comprobar esterilidad, luego se guardarán

en refrigeración hasta el momento de su uso. Se perforaron agujeros de 6 mm de diámetro, en los cuales se inocularon 30  $\mu$ L de la suspensión de esporas, luego se incubaron a 27°C por 14 días. Se utilizó etanol al 50% como control negativo el cual tuvo el mismo tratamiento que los extractos. Todo se realizó por quintuplicado.

- i. Interpretación de los resultados: Se midió el diámetro de la colonia del hongo en mm. Se calculó el porcentaje de inhibición comprobando el diámetro contra el de las colonias en las cajas control. Se tomó como positivo los extractos que redujeron el diámetro de la colonia en un 75%. Para la determinación de la CIM se utilizó el mismo procedimiento, pero con diluciones de extracto 1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL; la interpretación de los resultados fue la misma que se aplicó en el procedimiento de tamizaje.
- ii. Validación: Si no se observa crecimiento en el control negativo (etanol 50%) la prueba no es válida y debe repetirse.

d. Demostración de la actividad Anti-*Campylobacter jejuni*

Se realizó resiembras en medio de cultivo agar sangre-Columbia al 7.5%. Se tomó los viales que contienen la bacteria, los cuales se encontraban almacenados en el congelador de -80°C, con el asa bien caliente, se tomó la muestra, de preferencia fue hielo, se realizó un inóculo inicial, y luego se hizo 4 estrías perpendiculares al inóculo inicial. Se incubó a 36°C por 48 h. Se observó colonias mucoides, planas y extendidas sobre la superficie del medio (efecto swarming), o colonias pequeñas, de color grisáceo, en forma de gotas de rocío. Se comprobó la identidad de las colonias por tinción de Gram, prueba de oxidasa, prueba de catalasa e hidrólisis del hipurato. Se almacenó en viales con caldo tripticasa soya y glicerol al 15%, hasta el momento de realizar el bioensayo de actividad antimicrobiana.

- i. Ensayo de actividad contra *Campylobacter jejuni*, por extractos de plantas: Se pesó 1 mg de los extractos a evaluar y se disolvió en 1 mL de etanol al 50%, se colocó en viales debidamente limpios. Se impregnó con 50  $\mu$ L de cada extracto en una concentración de 1 mg/mL discos, bajo la campana de flujo laminar (se impregno 10  $\mu$ L diarios, ya que es la cantidad que se absorbe bien en el disco). Se tomó 3 - 5 colonias de *C. jejuni* en un tubo con 1 mL de caldo tripticasa soya, se incubó a 36°C por 30 min, se verificó que la turbidez sea aproximadamente igual al estándar de MacFarland 3, que es equivalente a  $9 \times 10^8$  UFC/mL. Se inoculó con un hisopo estéril en cuatro direcciones sobre la caja de agar sangre. Antes de 15 min y no menos de 5 min, cuando el medio ya absorbió la carga bacteriana, se colocó los discos con los extractos impregnados, se incluyó un disco de ácido nalidíxico de 30  $\mu$ g como control positivo y un disco impregnado únicamente con etanol 50%, como control negativo.
  - ii. Interpretación de resultados: Un halo de inhibición de crecimiento  $\geq 20$  mm, se consideró como extracto activo. Ausencia de inhibición o halo de crecimiento  $< 20$  mm, se consideró como extracto inactivo.
  - iii. Validación: El control negativo no presentó halo de inhibición. El control positivo se evaluó de la siguiente manera: *C. jejuni* sensible al ácido nalidíxico ( $\geq 20$  mm).
4. Tamizaje de la actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*.
- a. Procedimiento

El ensayo frente a *A. salina*, se realizó según lo descrito por Meyer y colaboradores (1982).

i. Preparación del agua de mar:

- En un vaso de precipitar, se disolvió 35 g, de la sal de mar en un litro de agua destilada.
- Se marcó el volumen inicial de agua en el vaso de precipitar.
- Se filtró y refrigeró hasta el momento de usar, la solución es estable por un mes a temperatura de 6-8°C.

ii. Cultivo de *A. salina*

- Se forró la mitad de una pecera con papel aluminio.
- Se colocó en un vaso de precipitar 200 mL del agua de mar y aireó por 30 min.
- Se colocó el agua en la pecera y se agregaron aproximadamente 40 mg de huevecillos en el área cerrada (lado oscuro).
- Se incubó por 24 h a temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar, los nauplios (larvas) pasaron al área abierta de la pecera (lado con luz).
- No se movió la pecera después de agregados los huevos, ya que pasarían del área cerrada y esto ya no permitiría el conteo de nauplios.

b. Determinación de la citotoxicidad

- Se pesó 4 mg del extracto a ensayar y disolver con 2 mL de agua de mar. Se disolvió con un vortex.
- Se agregó por quintuplicado en una microplaca: 100  $\mu$ L del extracto disuelto, más 100  $\mu$ L de agua de mar con 10 - 15 nauplios. La concentración en este pozo es de mg/mL.

- Control negativo: 100  $\mu$ L de agua de mar en 100  $\mu$ L de agua de mar con 10 - 15 nauplios.
- Control positivo: 100  $\mu$ L de furosemda a una concentración de 2 mg/mL más 100  $\mu$ L de agua de mar con 10 - 15 nauplios.
- Incubar a temperatura ambiente con luz artificial por 24 h.
- Contar en el estereoscopio el número de nauplios muertos. Se agregó metanol a los pozos, se esperó por 15 min y se conto de nuevo todos los nauplios.

c. Validación

- Si se observó más del 10% de nauplios muertos en el control negativo la prueba no es válida y hay que repetirla de nuevo.
- El control positivo debe tener una  $CL_{50}$  de 0.148215-0.19856 mg/mL para validar la corrida.

d. Interpretación

- Se calculó el % de camarones muertos:
  - Se sumó el número de camarones muertos en los cinco pozos (X)
  - Se sumó el número total de camarones en los tres pozos (Y)
  - Se dividió X dentro de Y, y se multiplicó por 100
- Si él porcentaje de camarones muertos es mayor del 50%, repetir la prueba utilizando dosis de 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125 mg/mL.
- Se obtuvo los valores de X y Y en cada dosis y se determinó el valor de  $CL_{50}$  con el programa de computadora Finney (DOS)

- Si el porcentaje de muertos es menor del 50% la citotoxicidad es mayor de 1 mg/mL.

## 5. Actividad larvicida contra *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*

### a. Procedimiento

Se colocó en un vaso de precipitar 200 mL de agua de chorro y se dejó reposar por 48 h. Las larvas utilizadas de *A. aegypti* y *A. albimanus* fueron proporcionados por el Programa Nacional de Enfermedades Transmitas por Vectores.

Se pesó 2 mg del extracto a ensayar y se disolvió en 1 mL de agua de chorro reposada. En micro placa se agregó por quintuplicado:

- 100 µl del extracto disuelto más 100 µl de agua de chorro reposada con 10 - 15 larvas.
- Se incubó a temperatura ambiente (entre 25- 28°C).
- Se hizo un recuento en estereoscopio, el número de larvas muertas y se determinó la concentración letal al 100% (CL<sub>100</sub>). La prueba de tamizaje fue positiva si todas las larvas están muertas.
- Se calculó el CL<sub>100</sub> repitiendo la prueba utilizando dosis 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 mg/mL.
- Para el control negativo; se agregó solo 100 µl de agua chorro reposada con 10 - 15 larvas.

### b. Validación

- Si se observó más del 10% de larvas muertas en el control negativo la prueba no es válida y hay que repetirla de nuevo.

- El control positivo tuvo una  $CL_{100}$  por debajo de 0.125 mg/mL para validar la corrida.

c. Interpretación de los resultados

La prueba de tamizaje se tomo como positiva si todas las larvas se encontraban muertas.

Si el porcentaje de larvas muertas es 100%, calcular la  $CL_{100}$ , para ello es necesario repetir la prueba utilizando dosis de 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0,0625, 0.03125 mg/mL.

6. Bioensayo de *A. cepa*

a. Procedimiento:

i. Preparación de extractos:

- Pesar 1 g de extracto y disolverlo en 1 L de agua del chorro, para llegar a una concentración de 1 mg/mL.

ii. Preparación del bioensayo.

- Se colectaron cebollas blancas de 2 cm de diámetro en mercado local (Salamá, Baja Verapaz), se dejaron secar por dos semanas a temperatura ambiente, intercalando con exposiciones cortas al sol. (se retiraron todos los bulbos con crecimiento de tallo).
- Se limpió cuidadosamente 10 bulbos de cebolla por cada concentración evaluada. Se retiraron las catáfilas exteriores, raicillas (ápices) del disco inferior sin lastimar los primordios.
- Luego se sumergieron los bulbos hasta la mitad en agua de chorro durante 48 h en un lugar fresco y seco alejado de corrientes de aire y oscuro. Se repuso el volumen de agua perdido por lo menos dos veces al día.

- Se observó el crecimiento de las raíces, descartando todas aquellas cebollas que presentaron raíces con crecimiento menor a 2 cm, así como los bulbos que presentaron signos de putrefacción o crecimiento de tallo.
  - Se midieron 5 ápices más largos y cinco cortos y se calculó la media de crecimiento por cada cebolla, se descartaron los valores muy altos o bajos (se numeró cada cebolla como individuo y la serie de 5 tubos de cada concentración evaluada).
- iii. Ensayo de citotoxicidad.
- Se utilizaron 5 bulbos de cebolla sumergidos en cada una de las concentraciones de extracto, se dejó el crecimiento por 48 h, en un ambiente oscuro. El volumen del extracto utilizado fue de 70 mL aproximadamente (en los tubos de 7 cm de largo).
  - El control negativo fue evaluado con agua de chorro, misma en la que se disolvió cada extracto. Para el control positivo se utilizó Paraquat® a concentración de 0.04 mg/mL. (se colocó papel aluminio en los contenedores del herbicida por la fotosensibilidad que presenta).
  - Se midieron los ápices por cada cebolla, por cada concentración y controles, se expresaron los resultados en medias. (de acuerdo al procedimiento de recuento anteriormente descrito).
- iv. Ensayo de genotoxicidad.
- Se cortaron los ápices en las porciones distales, con 1 mm de grosor colocándolos en un vidrio de reloj con 1 a 2 mL de orceina acética.

- Se calentó la preparación hasta que emitiera vapores y retirándolo del mechero evitando ebullición y desecación, se repitió el procedimiento hasta cumplir 4 min.
- Se procedió a realizar 5 preparados de cada concentración de la siguiente forma: en un portaobjetos se colocó 1 o 2 porciones de ápices teñidos (con un mínimo aproximado de 1000 células), agregando un gota de gelatina (como medio de montaje y preservación), se colocó un cubreobjetos y se hizo presión con la goma de borrar de un lápiz obteniendo una distribución homogénea de las células en el frote.
- Se realizó la observación de células en objetivo de 100X contando 1000 células por cada frote. Haciendo un total de 5000 células por concentración. La lectura del frote se realizó haciendo la distribución por cada fase (interfase, profase, anafase, metafase y telofase).
- Se realizó la observación de anomalías celulares como: binucleaciones, anafases rezagadas o desorganizadas, micronúcleos u otras aberraciones.

b. Evaluación

i. Citotoxicidad:

- Medir longitud de las raíces en 48 h de exposición y reportar en medias

Calculo de Índice Mitótico

$$(IM) = \frac{\text{Número de células en división (P, A, M, T)}}{\text{a 1000 células observadas}} * 100$$

IM = Índice mitótico

ii. Genotoxicidad:

- Análisis de anafase/telofase: no se observaron estructuras que indicaran anomalías cromosómicas (fragmentos acéntricos, cromosomas errantes, anafases desorganizadas) ni anomalías nucleares (micronucleaciones, binucleaciones).
- Porcentaje de Inhibición (IN):  $= (IM \text{ control neg} - IM \text{ concentración}) * 100 / IM \text{ control neg}$ .

c. Validación

Se utilizó agua de chorro como control negativo. Se utilizó Paraquat®, como control positivo que debía tener un crecimiento menor al 50% que el control negativo.

**F. Diseño de la investigación**

1. Actividad anti bacteriana.

Se realizó un estudio experimental, con diseño de bloques al azar (un bloque = una caja), con 16 estrías correspondientes a una bacteria distinta, colocadas aleatoriamente. Para los extractos que presenten inhibición significativa se determinó la CIM.

a. Variables de interés

Variable dependiente: Crecimiento o inhibición de bacterias estudiadas.

Variable independiente: 3 extractos etanólicos de plantas medicinales de la familia *Euphorbiaceae*.

b. Análisis de datos

Se realizó la prueba de hipótesis binomial, donde se efectuó 5 réplicas para un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$  (según la tabla de distribución binomial) esperando que las 5 réplicas den el mismo resultado.

Prueba de hipótesis binomial donde:

Ho:  $p \leq 0.5$  (No tiene efecto inhibitorio)

Ha:  $p > 0.5$  (Si tiene efecto inhibitorio)

Para rechazar “Ho” y concluir que el extracto tiene efecto inhibitorio, se deben tener 5 replicas de inhibición para las bacterias utilizadas en el bioensayo.

2. Actividad contra *Campylobacter jejuni*

Se realizó un estudio experimental con diseño totalmente al azar. Enfrentando discos impregnados con los extractos de estudio, discos de ácido nalidíxico (control positivo) y eritromicina (control negativo) contra la bacteria *C. jejuni*.

a. Variables de interés

Variable dependiente: Inhibición de *C. jejuni* y no inhibición de *C. jejuni*.

Variable independiente: 3 extractos etanólicos de plantas medicinales de la familia *Euphorbiaceae*.

b. Análisis de datos

Se realizó la prueba de hipótesis binomial, donde se efectuó 5 réplicas para un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$  (según la tabla de distribución binomial) esperando que las 5 réplicas den el mismo resultado.

Ho:  $p \leq 0.5$  (No tiene efecto inhibitorio)

Ha:  $p > 0.5$  (Si tiene efecto inhibitorio)

Para rechazar “Ho” y concluir que el extracto tiene efecto inhibitorio, se deben tener 5 replicas de inhibición para *C. jejuni*. Se comparó la inhibición provocada por los extractos, con la inhibición del ácido nalidíxico que debe ser  $> 20$  mm, para concluir que hay inhibición.

### 3. Actividad antimicótica (levaduras)

Se realizó un estudio experimental, con diseño de bloques al azar (un bloque = una caja), con 16 estrías correspondientes a una bacteria distinta, colocadas aleatoriamente.

Para los extractos que presente inhibición significativa se determinó la CIM.

#### a. Variables de interés

Variable dependiente: crecimiento o inhibición de levaduras a estudiar.

Variable independiente: 3 extractos etanólicos de plantas medicinales de la familia *Euphorbiaceae*.

#### b. Análisis de datos

Se realizó la prueba de hipótesis binomial, donde se efectuó 5 réplicas para un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$  (según la tabla de distribución binomial) esperando que las 5 réplicas den el mismo resultado.

Prueba de hipótesis binomial donde:

Ho:  $p \leq 0.5$  (No tiene efecto inhibitorio)

Ha:  $p > 0.5$  (Si tiene efecto inhibitorio)

Para rechazar “Ho” y concluir que el extracto tiene efecto inhibitorio, se deben tener 5 replicas de inhibición para los hongos utilizados en el bioensayo.

#### 4. Actividad antimicótica (fase miceliar)

Se realizó un estudio experimental con diseño totalmente al azar, en el cual se realizará una prueba de hipótesis binomial. Para los extractos que presenten efecto inhibitorio significativo se determinó la CIM.

##### a. Variables de interés

Variable dependiente: Crecimiento o inhibición de micelio de hongos.

Variable independiente: 3 extractos etanólicos de plantas nativas de Guatemala.

##### b. Análisis de datos

Se realizó la prueba de hipótesis binomial, donde se efectuó 5 réplicas para un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$  (según la tabla de distribución binomial) esperando que las 5 réplicas den el mismo resultado.

Prueba de hipótesis binomial donde:

Ho:  $p \leq 0.5$  (No tiene efecto inhibitorio)

Ha:  $p > 0.5$  (Si tiene efecto inhibitorio)

Para rechazar “Ho” y concluir que el extracto tiene efecto inhibitorio, se deben tener 5 replicas de inhibición para los hongos utilizados en el bioensayo.

#### 5. Actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*

Se realizó un estudio experimental, donde se comparó el número de nauplios de *A. salina* muertos inicial con el número de muertos después del contacto por 24 h con los extractos en las siguientes diluciones: 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312 mg/mL.

##### a. Variables de interés

Variable dependiente: Muertes de nauplios de *A. salina*.

Variable independiente: 3 extractos etanólicos de plantas nativas de Guatemala.

b. Análisis de datos

Regresión no paramétrica, usando la transformación probit por medio del método de Finey, con la curva encontrada.

6. Actividad larvícida

Se realizó un estudio experimental, donde se comparó el número de larvas muertas inicial de primer estadio de *A. albimanus* y *A. aegypti* con el número de larvas muertas después del contacto durante 24 h con los extractos en las siguientes diluciones: 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312 mg/mL.

a. Variables de interés

Variable dependiente: Muerte de larvas de primer estadio de *A. albimanus* y *A. aegypti*.

Variable independiente: 3 extractos etanólicos de plantas medicinales de la familia *Euphorbiaceae*.

b. Análisis de datos

Regresión no paramétrica, usando la transformación probit por medio del método de Finey, con la curva encontrada.

7. Efectos de citotoxicidad en células de *A. cepa*

Se realizó un estudio experimental totalmente al azar. Donde se expuso bulbos de cebolla a los tres extractos de estudio, a un control positivo y control negativo en 5 réplicas por cada uno. Se evaluó el crecimiento longitudinal de los ápices de *A. cepa*, en contacto con los tratamientos. Se midió la longitud del crecimiento de los ápices y se calculó el promedio de crecimiento del total de ápices de cada cebolla (*A. cepa*).

a. Variable de interés

Variable dependiente: crecimiento o no crecimiento de longitud de ápices de cebolla.

Variable independiente: 3 extractos etanólicos de plantas medicinales de la familia *Euphorbiaceae*.

b. Análisis de Datos

Se realizó un análisis de varianza de una vía. Se compararon los extractos y el control negativo, frente al control positivo por medio de la prueba de Dunnett ( $\alpha= 0.05$ )

8. Efectos de genotoxicidad en células de *A. cepa*

Se realizó un estudio experimental totalmente al azar. Donde se expuso cebollas a diluciones de los tres extractos de estudio, a un control positivo y control negativo en 5 replicas por cada uno. De los cuales se calculara 5 índices mitóticos por cada tratamiento.

a. Variable de interés

Variable dependiente: Índice mitótico de las células de *A. cepa*.

Variable independiente: 3 extractos etanólicos de plantas medicinales de la familia *Euphorbiaceae*.

b. Análisis de datos

Análisis de varianza de un vía. Si hay diferencia significativa, se compararon los extractos y el control negativo, frente al control positivo por medio de la prueba de Dunnett ( $\alpha= 0.05$ ). Se realizó una descripción de las aberraciones nucleares y cromosómicas encontradas en las cebollas después del contacto con los extractos.

## VIII. RESULTADOS

Se obtuvieron extractos etanólicos de tres plantas de la familia *Euphorbiaceae* de consumo humano. El origen de la materia prima de *E. lancifolia* fue proporcionada por la Asociación de Servicios Comunitarios de Salud (ASECSA) ubicada en el departamento de Chimaltenango en donde es utilizada para su comercialización. Las variedades de *C. aconitifolius* provienen de granjas de la Universidad del Valle de Guatemala, ubicadas en Escuintla donde se reproducen para su estudio.

Como se observa en el Cuadro 1, el extracto que presentó mayor rendimiento fue *C. aconitifolius* var. *estrella*, con un 23.41%, seguido de *C. aconitifolius* var. *mansa* con 20.15% y *E. lancifolia*, con 8.30%.

**Cuadro 1.** Rendimiento de los Extractos etanólicos de tres plantas de la familia *Euphorbiaceae*

Planta	Departamento de Procedencia	Coordenadas geográficas	Nombre común	% rendimiento	Organo
<i>E. lancifolia</i>	Chimaltenango	14°39'19" N / 90°49'1" O	Ixbut	8.30	Hojas
<i>C. aconitifolius</i> var. <i>mansa</i>	Escuintla	14°19'52" N / 91°3'36" O	Chaya mansa	20.15	Hojas
<i>C. aconitifolius</i> var. <i>estrella</i>	Escuintla		Chaya estrella	23.41	Hojas

**Fuente:** Datos experimentales, Departamento de Citohistología, USAC. 2010-2012.

% de rendimiento = (cantidad de extracto obtenido/ peso de planta en seco) X 100

### A. Actividad biocida *in vitro* contra bacterias, levaduras y hongos miceliares.

Mediante el método de dilución en agar descrito por Mitscher y colaboradores (1972). Se realizó el tamizaje antibacteriano contra: bacterias Grampositivo (*B. subtilis* ATCC™ 6051 y *S. aureus* ATCC™ 25923), bacterias gramnegativo (*E. coli* ATCC™ 25922, *P. aeruginosa* ATCC™ 27853, *S. typhi* ATCC™ 14028) y micobacterias (*M. smegmatis* ATCC™ 607). El único extracto que presento actividad inhibitoria *in vitro* significativa fue *E. lancifolia* a una concentración de 1 mg/mL contra *B. subtilis* (p=0.0312) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Tamizaje de la actividad biocida contra bacterias de los extractos etanólicos en estudio a una concentración 1 mg/mL.

Extracto Etanólico	<i>M. smegmatis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
Etanol 50% (control negativo)	-	-	-	-	-	-
Cefotaxima 0.1 mg/mL (control positivo)	+	+	+	+	+	+
<i>C. aconitifolius</i> var. <i>estrella</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. aconitifolius</i> var. <i>mansa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E. lancifolia</i>	-	-	-	-	-	+

**Fuente:** Datos experimentales, Departamento de Citohistología, USAC. 2010-2012.

Donde: (-): actividad negativa del extracto; (+): actividad positiva del extracto. \*p=0.0312.

Se determinó la actividad antilevadura de los extractos por el método de dilución en agar contra los hongos levaduriformes: *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. albicans* y *C. tropicalis*. Como se observa en el Cuadro 3 ningún extracto mostró actividad antilevadura significativa (p=0.0312).

El ensayo antifúngico se realizó utilizando la metodología descrita por Brancato & Golding (1983), modificado por MacRae y colaboradores (1988), para hongos filamentosos. El tamizaje antifúngico se realizó contra los siguientes hongos: *M. gypseum*, *M. canis*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *A. flavus* y *A. niger*. Solamente el extracto de *E. lancifolia* (Ixbut) presentó actividad positiva (+) significativa contra *T. mentagrophytes* a una concentración de 1 mg/mL ( $p>0.05$ ) (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Tamizaje de la actividad biocida contra levaduras y hongos miceliares de los extractos etanólicos en estudio a una concentración 1 mg/mL.

Extracto Etanólico	Levaduras			Hongos miceliares						
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>
Etanol 50% (Control negativo)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. aconitifolius</i> var. <i>estrella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. aconitifolius</i> var. <i>mansa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. lancifolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

**Fuente:** Datos experimentales, Departamento de Citohistología, USAC. 2010-2012. Donde: (-): actividad negativa del extracto; (+): actividad positiva del extracto. \* $p=0.0312$ .

La CIM del extracto de *E. lancifolia* contra *B. subtilis* y contra la fase miceliar de *T. mentagrophytes*, presentó actividad a una concentración de 1 mg/mL ( $p=0.0312$ ).

La actividad contra *C. jejuni* fue evaluada con la cepa ATCC™ 33291, por el método de difusión con discos impregnados de extractos a una concentración de 1 mg/mL. Ningún

extracto presentó actividad inhibidora *in vitro* significativa contra *C. jejuni* ( $p>0.05$ ) (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Tamizaje de la actividad biocida contra *C. jejuni* de los extractos etanólicos en estudio a una concentración 1 mg/mL.

5Extracto Etanólico	Bacteria
	<i>C. jejuni</i>
Ácido nalidíxico (control positivo)	+
Etanol 50% (control negativo)	-
<i>C. aconitifolius</i> var. <i>Estrella</i>	-
<i>C. aconitifolius</i> var. <i>Mansa</i>	-
<i>E. lancifolia</i>	-

**Fuente:** Datos experimentales, Departamento de Citohistología, USAC. 2011-2012. Donde: (-): actividad negativa; (+): actividad positiva. \*  $p=0.0312$

#### B. Actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina*:

La actividad citotóxica fue evaluada mediante la prueba en placa de *A. salina*. Todos los extractos mostraron una  $CL_{50}$  menor a 1 mg/mL. El extracto con mayor actividad citotóxica fue *E. lancifolia* con valor de  $CL_{50}$  de 0.128925 mg/mL; le siguen en orden decreciente *C. aconitifolius* var. *estrella* con valor de  $CL_{50}$  de 0.271779 mg/mL y *C. aconitifolius* var. *mansa* con un valor de  $CL_{50}$  0.49838 mg/mL (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina* de extractos en estudio.

Extracto en estudio	$CL_{50}$ mg/mL
<i>E. lancifolia</i>	0.128925
<i>C. aconitifolius</i> var. <i>mansa</i>	0.498393
<i>C. aconitifolius</i> var. <i>estrella</i>	0.271779
Furosemida	0.170091

**Fuente:** Datos experimentales, Departamento de Citohistología, USAC. 2011-2012

### C. Actividad larvicida

Se evaluó la actividad de los extractos contra larvas de los mosquitos *A. albimanus* y *A. aegypti* mediante ensayo en placa por quintuplicado. Todos los extractos mostraron una  $CL_{100}$  menor a 1 mg/mL en larvas de primer estadio (L1) de *A. albimanus*. El extracto con mayor actividad fue *C. aconitifolius* var. *estrella* con una  $CL_{100}$  de 0.351647. Se continuó evaluando la actividad contra larvas de *A. albimanus* en larvas de segundo estadio (L2) observando una  $CL_{100} > 1$  mg/mL, por lo cual no se evaluaron los siguientes estadios larvarios (L3 y L4). Ningún extracto mostró actividad  $CL_{100}$  en larvas de primer estadio de *A. aegypti* (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Actividad larvicida contra *A. aegypti* y *A. albimanus* en larvas del primer y segundo estadio de los extractos en estudio.

Extracto	<i>A. aegypti</i>		<i>A. albimanus</i>			
	Estadio	$CL_{100}$ *	Estadio	$CL_{100}$ *	Estadio	$CL_{100}$ *
<i>E. lancifolia</i>	L1	1.68788	L1	0.954676	L2	1.55767
<i>C. aconitifolius</i> var. <i>mansa</i>	L1	1.63001	L1	0.569424	L2	1.55745
<i>C. aconitifolius</i> var. <i>estrella</i>	L1	1.62846	L1	0.351647	L2	1.44795
Temephos®	L1	0.0233486	L1	0.0715284	L2	0.0236286

**Fuente:** Datos experimentales, Departamento de Citohistología, USAC. 2011-2012. Dónde: estadio L1: primer estadio larvario; estadio L2: segundo estadio larvario;  $CL_{100}$  mg/mL: en percentil para 100% de nauplios muertos. \* mg/mL.

#### **D. Actividad citotóxica en ápices de *A. cepa***

La actividad citotóxica de los tres extractos etanólicos fue evaluada en ápices de cebolla tratados con agua durante 48 h, se evaluó el porcentaje de crecimiento de los mismos mediante un análisis de varianza de una vía (Anexo I). *C. aconitifolius* var. *mansa*, *C. aconitifolius* var. *estrella* presentan actividad citotóxica en los ápices de *A. cepa* ( $p < 0.0001$ ), ya que frente a ellos existe una reducción del crecimiento de los ápices de cebolla en todas las concentraciones ensayadas mayores o iguales al 40% (Cuadro 8). *E. lancifolia* por su parte presenta una mínima reducción del porcentaje de crecimiento pues todos los ápices mostraron crecer más del 60% así mismo se observó que a concentraciones más bajas (0.5 y 0.25 mg/mL) no presentó actividad ( $p < 0.0001$ ).

Por medio de análisis de varianza de una vía (Anexo 4), se evaluó la actividad de los extractos etanólicos respecto al potencial genotóxico sobre células apicales de cebolla. Todos los extractos presentan un efecto reductor de índice mitótico (IM) dependientes de la concentración, encontrando que el extracto de *C. aconitifolius* var. *estrella* presenta mayor toxicidad que *C. aconitifolius* var. *mansa* seguida de *E. lancifolia*. *C. aconitifolius* var. *estrella* presenta el mayor porcentaje de inhibición respecto a los otros extractos ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Actividad citotóxica y genotóxica en ápices de *A. cepa*

Extractos mg/mL	Citotoxicidad		Genotoxicidad			
	Promedio de crecimiento mm $\pm$ DS	% CRE	Promedio de crecimiento mm $\pm$ 1 DS	IM	% IN	
Agua	35.52 $\pm$ 1.59	100	20.50 $\pm$ 1.45	20.46	0	
Paraquat®	0.04	9.58 $\pm$ 1.90*	28.93	6.3 $\pm$ 0.45	2.52*	86.18
	1	6.44 $\pm$ 0.83*	18.09	5.40 $\pm$ 0.77	5.28*	74.19
<i>C. aconitifolius</i> var. <i>mansa</i>	0.5	12.60 $\pm$ 1.22*	33.93	11.10 $\pm$ 1.62	11.00*	46.24
	0.25	20.64 $\pm$ 0.99*	57.68	18.60 $\pm$ 1.55	18.22**	10.95
	1	10.24 $\pm$ 1.84*	27.33	2.50 $\pm$ 1.33	3.04*	85.14
<i>C. aconitifolius</i> var. <i>estrella</i>	0.5	10.90 $\pm$ 0.60*	30.91	7.30 $\pm$ 0.48	7.20*	64.81
	0.25	16.28 $\pm$ 0.89*	45.80	9.90 $\pm$ 1.04	9.27*	54.69
	1	21.00 $\pm$ 4.43*	60.22	17.90 $\pm$ 1.56	17.80***	12.75
<i>E. lancifolia</i>	0.5	31.00 $\pm$ 8.72	83.13	--	--	--
	0.25	34.34 $\pm$ 4.22	97.17	--	--	--

**Fuente:** Datos experimentales; Agua: control negativo; Paraquat®: control positivo; DS= Desviación Estándar, % CRE: Porcentaje de crecimiento respecto al control negativo; IM: Índice Mitótico; % IN: Porcentaje de inhibición respecto al control negativo; \* p<0.0001, \*\*p<0.039, \*\*\*<0.010 nivel de significancia respecto al control negativo existe diferencia significativa entre los tratamientos. --: no se testeó.

## IX. DISCUSIÓN

La obtención de los extractos etanólicos, de las tres plantas de la familia *Euphorbiaceae* se realizó por medio del método de percolación y concentración en rotavapor, obteniendo buen rendimiento, siendo el mayor para *C. aconitifolius* var. *estrella* 23.41%. El porcentaje de rendimiento se ve influido por varios factores que incluyen la edad de las plantas, el órgano de la planta utilizado (raíz, tallo, hojas y semillas), la época de corte, y el tipo de disolvente (Rakshit et al., 2010).

Los resultados presentados en el Cuadro 2, muestran que *E. lancifolia* presentó actividad positiva contra *B. subtilis* a concentración de 1 mg/mL. En el estudio publicado por Cáceres (1996), se demostró que la tintura de *E. lancifolia* posee actividad biológica contra *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. typhi* a concentraciones de 1-10 mg/mL. En este estudio se encontró que el extracto etanólico de *E. lancifolia* no posee actividad contra dichas bacterias a una concentración < 1 mg/mL. Se determinó la CIM de *E. lancifolia* contra *B. subtilis* siendo esta 1 mg/mL (p=0.0312). Una revisión exhaustiva llevada a cabo en las bases de datos EBSCOhost, PubMed, y ScienceDirect, demostró que existe muy poca información sobre la composición química de *E. lancifolia*, siendo importante su caracterización fitoquímica para poder complementar los estudios sobre su actividad antibacteriana. Awoyinka, Balogun, & Ogunmowo, (2007), concluyeron que *C. aconitifolius* tuvo actividad contra *S. aureus* y *S. tiphy* utilizando la metodología de difusión en disco. En el presente estudio no se encontró actividad de *C. aconitifolius* var *mansa* y *C. aconitifolius* var *estrella* a concentración de 1 mg/mL, contra las bacterias estudiadas.

Se ensayó la actividad antilevadura por el método de dilución en placa, lo cual demostró que ningún extracto inhibe el crecimiento de hongos levaduriformes a concentración de 1 mg/mL. Se ha reportado la inhibición de levaduras (*C. albicans* y *C. neoformans*) por el extracto etanólico de *E. lancifolia* en dosis entre 1 – 10 mg/mL (Gupta, 2008).

Se reportan que *C. aconitifolius* ha demostrado la presencia de taninos, saponinas, alcaloides y flavonoides, metabolitos relacionados con actividad antimicrobiana (Awoyinka et al., 2007; Oyagbemi et al., 2011). Sin embargo en el presente estudio no se pudo determinar actividad antibacteriana ni antilevadura.

En el ensayo antifúngico el extracto que mostró actividad al tamizaje a concentración de 1 mg/mL fue *E. lancifolia* contra *T. mentagrophytes* demostrando una CIM de 1 mg/mL (Cuadro 4). Se ha descrito que las hojas tienen actividad contra hongos dermatofitos (*E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum*) en dosis entre 1 – 10 mg/mL (Gupta, 2008).

En el presente estudio se evaluó la actividad de los extractos etanólicos contra *C. jejuni* ATCC™ 33291, determinando que no tienen actividad inhibitoria *in vitro* sobre esta bacteria. En Guatemala se ha evaluado la actividad de aproximadamente 27 extractos etanólicos de plantas, los cuales no presentaron actividad *in vitro* contra *C. jejuni* (Alvarado, 2007; Álvarez, 2007; Ordoñez, 2007; Paz, 2005). En un estudio realizado por Samol & Santizo (2011) donde se evaluó la actividad de 12 extractos de especies alimenticias y condimentarias, se encontró actividad inhibitoria contra *C. jejuni* ATCC™ 33291 de tres extractos metanólicos de *Lippia alba* (Mill) N.E. ex Britton & P. Wilson, *Lippia graceolens* Kunth., y *Piper jacquemontianum* Kunth.; el extracto diclorometánico de

*Tagetes lucida* Cav.; y los aceites esenciales de *L. alba*, *Lippia chiapasensis* Loes, *Lippia graveolens* Kunth., *Ocimum micranthum* Willd, *Pimenta dioica* (L.) Merr., *Piper auritum* Kunth., *T. lucida*.

En la prueba de *A. salina*, el extracto *E. lancifolia* presenta una  $CL_{50}$  de 0.128925 mg/mL comparable con el control positivo (furosemida) que es un fármaco diurético que presenta buena correlación como control comparado con otros fármacos (Pérez, 2003). Se ha demostrado que la prueba de *A. salina* es un buen ensayo para iniciar la evaluación de la actividad citotóxica, por su alta sensibilidad a una gran variedad de sustancias químicas, además se ha señalado que en algunos casos los resultados de las prueba de *A. salina* coinciden con las pruebas de toxicidad en cultivos de células de mamíferos, por lo que los resultados del presente estudio pueden servir como base en futuras investigaciones sobre los metabolitos secundarios presentes en dicho extracto que ejercen la actividad citotóxica (Franssen et al., 1997; McLaughlin et al., 1991; Ticona et al., 1998).

Se evaluó la actividad larvicida de los extractos etanólicos en larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus*. Un buen larvicida debe controlar todos los estadios larvarios, condición que no se observó para los extractos ensayados; al no presentar actividad a 1 mg/mL, se depuso evaluar los estadios larvarios L3 y L4, en el caso de *A. albimanus* y L2, L3 y L4 en el caso de *A. aegypti*, por no tener eficacia larvicida en el estadio larvario previo. Todos los extractos presentaron actividad larvicida contra *A. albimanus* en larvas de primer estadio (Cuadro 7). El estudio muestra que las larvas de primer estadio de *A. albimanus* son más susceptibles a los extractos en comparación a las larvas de *A. aegypti* que mostraron una  $CL_{100}$  por encima de 1 mg/mL, esto puede explicarse sobre la base de los factores multidimensionales dependientes de la ecología, fisiología, bioquímica y genética de los

vectores, que varía con la especie, las poblaciones y la localización geográfica (Brown, 1986; Vargas, Córdova, & Alvarado, 2006).

Se ha encontrado que la efectividad de las plantas para matar a las larvas depende de las dosis aplicadas, tipo de disolvente, el órgano de la planta utilizada y la especie larvaria, por lo que es importante estudiar cómo estas variables pueden afectar la actividad larvicida de los extractos estudiados (Gómez, 2008). Las larvas de *A. albimanus* en segundo estadio mostraron una  $CL_{100}$  mayor a 1 mg/mL, mientras que en primer estadio fue menor a 1 mg/mL, resultado que puede apoyarse en base a las diferencias en la composición estructural y metabólica de los estadios larvarios.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad citotóxica y genotóxica sobre *A. cepa* demuestran que *C. aconitifolius* var. *estrella* y *C. aconitifolius* var. *mansa* presentan la mayor inhibición sobre los ápices de cebolla y la mayor reducción de los índices mitóticos, lo cual es dependiente de la concentración de los extractos (Cuadro 8), lo que correlaciona con otros estudios que indican que existe una relación lineal macroscópica y microscópica entre los parámetros de los extractos relacionados (Akinboro & Bakare, 2007; Akintonwa et al., 2009; Oyendare et al., 2009). En *A. cepa*, la inhibición del crecimiento de la raíz, siempre se debe a la reducción en el número de células (Akinboro & Bakare, 2007). El extracto *E. lancifolia* fue el único que no presentó actividad citotóxica en concentraciones de 0.5 y 0.25 mg/mL. No se han reportado estudios sobre el efecto citotóxico en *A. cepa* de los extractos evaluados en este estudio. *E. lancifolia* presenta IM de 17.80% a concentración de 1 mg/mL evidenciando bajo efecto depresor sobre ápices de *A. cepa*, siendo el extracto con menos actividad genotóxica comparado con los extractos de *C. aconitifolius* var. *estrella*, *C. aconitifolius* var. *mansa* que en este estudio demostraron

poseer efectos mitodepresivos del ciclo celular. Los efectos citotóxicos y genotóxicos de los extractos evaluados, pueden deberse a los metabolitos presentes en los mismos. También es importante determinar el efecto de las concentraciones de algunos minerales (hierro, calcio, magnesio, fosforo, zinc), presentes en las hojas de las plantas ya que estudios previos han demostrado que a concentraciones elevadas de estos minerales, ejercen un efecto mitodepresivo sobre el crecimiento apical de la cebolla (Vargas-Palominos, Martínez-Trujillo, Ortiz-Castro, & López-Bucio, 2007; Al-Moaruf, Muibat, Asiata, Isiaka, & Nureni, 2004). A pesar de la actividad mitodepresiva de los extractos a concentraciones variables no fue posible demostrar aberraciones cromosómicas en las células bajo el efecto de estos extractos.

Los resultados de *A. salina* y la prueba de *A. cepa* correlacionan mostrando una citotoxicidad de los extractos, en concentraciones menores a 1 mg/mL, lo que indica que son buenas técnicas de tamizaje para evaluar la citotoxicidad.

## X. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico con mayor rendimiento fue *C. aconitifolius* var. *estrella* con un 23.41% de rendimiento.
2. *E. lancifolia* presentó actividad significativa contra el hongo *T. mentagrophytes* y la bacteria *B. subtilis* a una CIM de 1 mg/mL ( $p=0.0312$ ).
3. Ningún extracto mostró actividad antilevadura, ni contra *C. jejuni*.
4. Todos los extractos presentaron una  $CL_{50} < 0.50$  mg/mL contra nauplios de *A. salina*.
5. El extracto con mayor actividad citotóxica fue *E. lancifolia* con una  $CL_{50}$  de 0.128925 mg/mL.
6. Todos los extractos presentan actividad larvicida contra *A. albimanus* en primer estadio con valores de  $CL_{100} < 1$  mg/mL.
7. *C. aconitifolius* var. *estrella* presentó el menor valor  $CL_{100}$  en larvas de primer estadio de *A. albimanus* con una  $CL_{50}$  de 0.351647 mg/mL.
8. Todos los extractos etanólicos evaluados por la prueba de *A. cepa* presentaron actividad citotóxica y genotóxica a concentración  $\leq 1$  mg/mL ( $p < 0.0001$ ).
9. El extracto con mayor porcentaje de inhibición del índice mitótico (%IN) respecto al control negativo, en la prueba de *A. cepa*, fue *C. aconitifolius* var. *estrella* con 54.69%IN a la concentración más baja evaluada (0.25 mg/mL) ( $p < 0.0001$ ).

## **XI. RECOMENDACIONES**

1. Identificar los metabolitos secundarios de los extractos que presentaron actividad biocida, citotóxica y genotóxica en este estudio.
2. Utilizar disolventes de diferente polaridad para evaluar los distintos metabolitos secundarios presentes en las plantas estudiadas.
3. Realizar estudios fitoquímicos, de actividad biocida y citotóxica, introduciendo variables como: época de colecta, altitud de cultivos, condiciones climáticas, diferentes tipos de suelo, para complementar los resultados de este estudio.
4. Utilizar nuevas plantas de la familia *Euphorbiaceae*, para determinar si tienen efecto biocida y citotóxico, con el objeto de identificar principios activos útiles en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos y agroindustriales.

## XII. REFERENCIAS

- Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1998). Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa*, Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 1739- 1745.
- Akinboro, A., & Bakare, A. (2007). Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, *112*, 470–475.
- Akintonwa, A., Awodelea, O., Afolayana, G. & Cokerb, H. (2009). Mutagenic screening of some commonly used medicinal plants in Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology*, *125*, 461–470.
- Al-Moaruf, A., Muibat, B., Asiata, I., Isiaka, O & Nureni, O. (2004). Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants of Nigeria. *Food Chemistry*, *85*, 67–71.
- Albertini, R., Nicklas, J., Skopek, T., Recio, I., & Oneill, J. (1998). Genetic instability in human t-lymphocytes. *Mutation research. Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, *400*, 381-389.
- Alvarado, C. (2007). Búsqueda de actividad contra *Campylobacter jejuni* en cinco plantas de uso popular guatemalteco. Tesis de graduación para optar al Título de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Alvárez, S. (2007). Determinación de actividad contra *Campylobacter jejuni* por extractos etanólicos de cinco plantas utilizadas popularmente para el tratamiento de afecciones gastrointestinales en regiones cálidas de Guatemala. Tesis de graduación para optar

al Título de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.  
Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

- Amer, A., & Mehlhorn, H. (2006). Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology Research*, 99, 466–472.
- Ames, B., McCann, J., & Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenesis test. *Mutation Research*, 31, 347-364.
- An, M. (2005). Mathematical modelling of dose response relationship (hormesis) in allelopathy and its application. *Nonlinearity in Biology, Medicine*, 3, 153–172.
- Anderson, J., Goetz, C., McLaughlin, J., & Suffness, M. (1991). A blind comparison of simple benchtop bioassay and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis*, 2, 107-111.
- Ankli, A., Heinrich, M., Bork, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., et al., (2002). Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 43–52.
- Aramba-Ic, M., Bjeli, S. & Subakov, G. (1994). Acute toxicity of heavy metals (Copper, Lead, Zinc), phenol and sodium on *Allium Cepa* L. *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* St: Comparative investigations and the practical applications. *Water Research*, 29, 497-503.
- Arencibia, D., Vidal, A., Rosario, L., & Delgado, L. (2010). Comparison of the Sprague Dawley rat's response against cyclophosphamide and bleomycin in the head sperm morphology assay. *ARS Pharmaceutica*, 51, 155-162.

- Argueta, V., Cano-Asseleih, L., & Rodarte, M. (1994). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. México: Instituto Nacional Indigenista.
- Ashby, J. (1988). Comparison of the techniques for monitoring human exposure to genotoxic chemicals. *Mutation Research*, 204, 542-551.
- Au, W., Cajas-Salazar, N., & Salama, S. (1998). Factors contributing to discrepancies in populations monitoring studies. *Mutation Research*, 400, 467-478.
- Ávila, L., Baquero, E., Viña, A., & Murrillo, E. (2006). Actividad antibacteriana de *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*. *Vitae*, 3, 55-60.
- Awoyinka, A., Balogun, I., & Ogunmowo, A. (2007). Phytochemical screening and in vitro bioactivity of *Cnidocolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 1, 63-65.
- Azeez, O., Oyagbemi, A., Oyeyemi, M., & Odetola, A. (2010). Ameliorative effects of *Cnidocolus aconitifolius* on alloxan toxicity in Wistar rats. *African Health Sciences*, 10, 283-291.
- Bansal, S., Singh K., Sharma, S., & Sherwani, M. (2011). Comparative larvicidal potential of different plant parts of *Withania somnifera* against vector mosquitoes in the semi-arid region of Rajasthan. *Journal of Environmental Biology*, 32, 71-75.
- Barahona, MV., & Sánchez-Fortún, S. (1999). Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. *Environmental Pollution*, 104, 469-476.

- Barbério A., Barros L., Voltolini J. & Mello, M. (2009). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the River Paraíba do Sul, in Brazil, with the *Allium cepa* L. test. *Journal Biology*, 69, 837-842.
- Beyra, Á., León, M., Iglesias, E., Ferrándiz, D., Herrera, R., Volpato, G., et al. (2004). Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 2, 185-204.
- Borah, R., Kalita, M., Kar, A., & Talukdar, A. (2010). Larvicidal efficacy of *Toddalia asiatica* (Linn.) Lam against two mosquito vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *African Journal of Biotechnology*, 9, 2527–2530.
- Brancato, F., & Golding, N. (1983). The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *Mycologia*, 45, 848-863.
- Bender, M., Griggs, H., & Beford, J. (1974). Recombinational DNA repair and sister-chromatid exchanges. *Mutation Research*, 24, 117-125.
- Breitmaier, E. (2006). *Terpenes (flavors, fragrances, pharmaca, pheromones)*. Weinheim: Wiley VCH Verlag.
- Bressani, R. (1993). *Valor nutritivo y usos en alimentación humana de algunos cultivos autóctonos subexplorados de Mesoamérica*. Guatemala: Food and Agricultura Organization of United Nations.
- Brown A. (1986). Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2, 123-140.
- Bruneton, J. 1999. *Pharmacognosy phytochemistry of medicinal plants*. Paris: Lavoisier.

- Burlingame, E., & Reddish, G. (1973). Laboratory methods for testing fungicides used in the treatment of epidermophytoses. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 14, 649-665.
- Bussmanna, R., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., et al. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 132, 101-108.
- Cáceres, A., Cano, O., Samayoa, B., & Aguilar, L. (1990). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Screening 84 plants against enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 30, 55-73.
- Cáceres, A. (1996). *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria.
- Cáceres, A., Álvarez, A., Ovando, A., & Samayoa, B. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases 1. Screening of 68 plants against Gram positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 31, 193-208.
- Cáceres, A., López, B., González, S., Berger, I., Tada, I., & Maki, J. (1998). Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. 1. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 195-202.
- Cambar, P. (1984). *Plantas Medicinales de Honduras*. Tegucigalpa: Universidad Autónoma de Honduras.
- Carbajal, M., Parra, V., & Rico, V. (1998). Effect of herbivory on sexual expression and reproductive success in the gynomonoic *Cnidoscolus aconitifolius* (*Euphorbiaceae*). *Biotrópica*, 30, 25-28.

- Carballo, M., Cortada, C., & Galano, A. (2005). Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. *Theoria: Revista teoría, historia y fundamentos de la Ciencia*, 14, 95-108.
- Carrano, A., & Natarajan, A. (1988). Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research*, 204, 379-406.
- Casimiro, T., Christofolletti, D., & Marin-Morales, M. (2009). Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1680–1686.
- Cecanho, R., Koo, H., Rosalen, P., Park, Y., & Cury, J. (1999). Effect of hydroalcoholic *Mikania laevigata* on bacterial growth and production of carbohydrate by streptococcus mutans. *Proceedings of the Fourteenth Annual Meeting the FESBE*, 14, 290-296.
- Changying, Z., Wenquan, W., Yun, Z., Xin, C., & Weiping, B. (2009). Conservation and divergence of microRNAs and their functions in Euphorbiaceous plants. *Nucleic Acids Research*, 38, 981-995.
- Chellaiah, M., Muniappan, A., Nagappan, R., & Savarimuthu, I. (2006). Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2, 1-10.
- Chu, Y., & Malling, H. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 61, 1306-1312.
- Cifuentes, R., Poll, E., Bressani, R., Yurrita, S. (2010) Caracterización Botánica, Molecular, Agronómica y Química de los cultivares de Chaya (*Cnidoscolus*

- aconitifolius*) de Guatemala. *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala*, 21, 34-48
- Claxton, D., Houk, S., Monteith, G., Myers, E. & Hughes, J. (1991). Assessing the use of known mutagens to calibrate the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay: I. Without exogenous activation. *Mutation Research*, 253, 137-147.
- Clive, D., McCuen, R., Spector, J., Piper, C., & Mavournin, K. (1983). Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 115, 225-251.
- Cordero, C. (2002). Implementación de un método in vitro de evaluación preliminar de actividad anticáncer de extractos vegetales empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Tesis pregrado, Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Cui, Z., Xu, X., Trainor, N., Triffitt, J., Urban, J., & Tirlapur U. (2007). Application of multiple parallel perfused microbioreactors and three-dimensional stem cell culture for toxicity testing. *Toxicology In Vitro*, 21, 1318-1324.
- Das, M., & Ansari, M. (2003). Evaluation of repellent action of *Cymbopogon martinii martinii* var. *sofia* oil against *Anopheles sundiacus* in tribal villages of Car Nicobar Island, Andaman & Nicobar Islands, India. *Journal of Vector Borne Diseases*, 40, 101-4.
- Deiters, A., Cropp, T., Mukherji, M., Chin, J., Anderson, J., & Schultz P. (2003). Adding Amino Acids with Novel Reactivity to the Genetic Code of *Saccharomyces Cerevisiae*. *American Chemical Society*, 125, 11782-11783.

- Deleón, M. (1995). Inhibición de bacterias patógenas de siete plantas nativas del departamento de Alta Verapaz para el tratamiento de infecciones. Tesis pregrado, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Dimayuga, R., & García, S. (1991). Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur México. *Journal of Ethnopharmacology*, 31, 181-192.
- Domingo, D., & López, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16, 385-393.
- Doyle, B., Frasier, J., Bellows, L., Locklear, T., Perez, A., Gomez- Laurito, J., & Mahady, G. (2009). Estrogenic effects of herbal medicines from Costa Rica used for the management of menopausal symptoms. *Menopause*, 16, 748-755.
- Dressler, R. (1961). Synopsis of Poinsettia (*Euphorbiaceae*). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 48, 329-341.
- Elliott, B., Combes, R., Elcombe, C., Gatehouse, D., Gibson, G., Mackay, J.M., et al. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
- Evans, F., & Kinghorn, A. (1977). A comparative phytochemical study of the diterpenes of some species of the genera Euphorbia and Elaeophorbia (*Euphorbiaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 74, 93.
- Fabio, A., Cermelli, C., Fabio, G., Nicoletti, P., & Quaglio, P. (2007). Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. *Phytotherapy Research*, 4, 374-377.
- Fishman, J.A., & Rubin, R.H., (1998). Infection in organ transplant recipients. *New England Journal of Medicine*, 338, 1741-1751.

- Fiskesjö, G. (1985). The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, *102*, 98–112.
- Fiskesjö, G. (1988). The allium test. An alternative in environmental studies: The relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*, *197*, 243-260.
- Fiskesjö, G. (1993). Technical Methods Section. Allium Test I: A 2-3 day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, *8*, 461- 470.
- Fiskiejö, G. (1985). The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, *102*, 99-112.
- Fleming, R.V., Walsh, T.J., & Anaissie, E.J. ( 2002). Emerging and less common fungal pathogens. *Infectious Disease Clinics of North America*, *16*, 915–933.
- Flores, J., Canto-Aviles, G., & Flores-Serrano, A. (2001). Plantas de la flora yucatanense que provocan alguna toxicidad en el humano. *Revista Biomédica*, *12*, 86-96.
- Franssen, J., Smeijsters, L., Berger, I., & Medinilla, B. (1997). *In vivo* and *in vitro* antiplasmodial activities of some plants traditionally used in Guatemala against Malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *41*, 1500–1503.
- Freshney, R. (2000). *Culture of animal cell: A manual of basic technique*. New York: John Wiley and Sons Incorporation.
- Galli, A., Franzetti, L., & Briguglio, D. (1985). Attività antimicrobica in vitro di oli essenziali ed estratti di spezie di uso alimentare. *Industria Alimentaria*, *1*, 463-466.
- Garbino, J., Kolarova, L., Lew, D., Hirschel, B., & Rohner, P. (2001). Fungemia in HIV-infected patients: a 12-year study in a tertiary care hospital. *AIDS Patient Care STDs*, *15*, 407–410.

- García, A., Ávila, Y., Alonso, L., López, P., Ruiz, A., & Morón, F. (2009). Reacciones adversas reportadas por consumo de productos naturales en Cuba durante 2003 y 2007. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *14*, 1-11.
- García, A., & Delgado, G. (2006). Cytotoxic cis-fused bicyclic sesquiterpenoids from *Jatropha neopauciflora*. *Journal of Natural Products*, *69*, 1618–1621.
- Gómez, A. L. (2008). Caracterización de extractos y aceites esenciales y evaluación de la actividad biológica de hojas de tres especies de piperáceas (*P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. umbellatum*). Tesis de graduación para optar al Título de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Govindarajan, M., Jebanesan, A., Pushpanathan, T., & Samidurai, K., (2008). Studies on the effect of *Acalypha indica* (*Euphorbiaceae*) leaf extracts on the malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, *103*, 691-695.
- Graf, U., Alonso-Moraga, A., Castro, R., & Díaz, E. (1994). Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* somatic mutation and recombination test. *Food and Chemical Toxicology*, *32*, 423-30.
- Grant, W. (1982). Chromosome aberration assays in allium: A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, *99*, 273-291.
- Grant, W. (1994). The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research*, *310*, 175-185.

- Grant, W. (1999). Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutation Research*, 426, 107–112.
- Griffith, L. & Swartz, M. (2006). Capturing complex 3d tissue physiology *in vitro*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 211-224.
- Guerrero, M., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M., & Román, L. (2004). Vasorelaxant effect of new neo-clerodane diterpenoids isolated from *Croton schiedeanus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 94, 185–189.
- Gupta, M. (2008). Plantas Medicinales Iberoamericanas. Colombia: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología CYTED.
- Gutiérrez, L, Naranjo, N., Cienfuegos, A, Muskus, C., Luckhart, S., Conn, J.E., et al. (2009). Population structure analyses and demographic history of the malaria vector *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae) from the Caribbean and the Pacific regions of Colombia. *Malaria Journal*, 8, 259.
- Guzmán-Rincón, M., & Graf, U. (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. En F. Butterworth, L. Corkum, & J. Guzmán-Rincón, *Biomonitoring and biomarkers and indicators of environmental change* (pp. 169-181). New York: Plenum Press.
- Harwig, J., & Scott, P. (1971). Brine shrimp (*Artemia salina*) larva as a screening system for fungal toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 21, 1011-1016.
- Hecker, E., & Schmidt, R. (1974). Phorbol esters: irritants and carcinogens of *Croton tiglium*. *Progress In The Chemistry Of Organic Natural Products*, 31, 377–467.

- Herrero, O., Pérez. P., Fernández, F., Carvajal, A. & Peropadre, M. (2012). Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutation Research*, 743, 20– 24.
- Hoffmann, G. (1996). Genetic toxicology. En G. Hoffmann (5a. Ed.), *Toxicology: the basic science of poisons* (pp. 269-300). New York: Cassarett and Doull's.
- Houk, V. (1992). *The toxicology of industrial wasted and effluents: A review*. USA: Environmental Protection Agency, Research Triangle Park.
- Hoy, C., Head, G., & Hall, F. (1998). Spatial heterogeneity and insect adaptation to toxins. *Annual Review of Entomology*, 43, 571–94.
- Hulin, V., Mathot, A., Mafart, P., & Dufossé, L. (1998). Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des Aliments*, 18, 563-582.
- Iannacone J., Alvariño L. & Mansilla J. (2002). Actividad insecticida de cuatro extractos botánicossobre larvas de los mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae) y *Chironomus calligraphus* (Díptera:Chironomidae). *Wiñay Yachay*, 6, 56 - 71.
- Iannacone, J., & Alvariño, L. (1998). Ecotoxicidad aguda del insecticida rganofosforado temephos sobre *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera:Chironomidae). *Acta Entomológica Chilena*, 22, 53-55.
- Jaki, B., Orjala, J., Bürji, HR., & Sticher, O. (1999). Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. (1999). *Pharmaceutical Biology*, 37,138-143.
- Käfer, E., Scott B., & Kappas, A. (1986). Systems and results of tests for chemical induction of mitotic malsegregation and aneuploidy in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 167, 9-34.

- Kapil, B., Koul, I., Banerjee, S., & Gupta, B. (1993). Antihepatotoxic effects of major diterpenoid constituents of *Andrographis paniculata*. *Biochemical Pharmacology*, *46*, 182–185.
- Kinghorn, A. (1991). New techniques for the isolation and identification of phorbol esters and structurally related diterpene. En R. Keeler (6ta. Ed.), *Toxicology of plant and fungal compounds, Handbook of natural toxins* (pp. 217–242), New York: Marcel Dekker.
- Kingsbury, J. (1964). *Poisonous plants of the United States and Canada*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.
- Kirkbride, J., Gunn, C., & Dallwitz, M. (2006). *Family guide for fruits and seeds*. United States: Department of Agriculture.
- Kristen, U. (1997). Use of higher plants as screens for toxicity assessment. *Toxicology in vitro*, *11*, 181-191.
- Kumari, G., Aravind, S., Balachandran, J., Ganesh, M., Devi, S., Rajan, S., et al. (2003). Antifeedant neo-clerodanes from *Teucrium tomentosum* Heyne (Labiatae). *Phytochemistry*, *64*, 1119–1123.
- Kunz-Schughart, L., Freyer, J., Hofstaedter, F., & Ebner, R. (2004). The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *Journal of Biomolecular Screening*, *9*, 273-85.
- Kupchan, S., Nelida, I., Branfman, A., Dailey, R., & Fei, B. (1976). Antileukemic principles isolated from *Euphorbiaceae* plants. *Science*, *191*, 571-572.
- Kuti, J. & Konoru, H. (2006). Cyanogenic glycosides content in two edible leaves of tree spinach (*Cnidocolus* sp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*, 556–561.

- Lagarto, A., Silva R., Guerra, I., & Iglesias, L. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8, 395 -400.
- Leme, D., & Marin-Morales, M. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Journal Mutation Research*, 682, 71–81.
- Loaiza, J., Scott, M., Bermingham, E., Rovira, R., & Conn, J., (2010). Evidence for Pleistocene population divergence and expansion of *Anopheles albimanus* in Southern Central America. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82, 156–164.
- Luziatelli, G., Sørensen, M., Theilade, I., & Per, M. (2010). Asháninka medicinal plants: a case study from the native community of Bajo Quimiriki, Junín, Peru. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 21, 1-23.
- MacRae, W. D., Hudson, J.B., & Towers, G. H. (1988). Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 22, 143-172.
- Malavige, G., Fernando, S., Fernando, D., & Seneviratne, S. (2004). Dengue viral infections. *Postgraduate Medical Journal*, 80, 588–601.
- Marston, A., Maillard, M., & Hostettmann, K. (1993). Search for antifungal, molluscicidal and larvicidal compounds from African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 38,215-223.
- Martínez, M., Del Ramo, J., Torreblanca, A., & Díaz-Mayans. (1998). Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia partenogenética*.. *Aquaculture*, 172, 315-325.

- Mawardi, R., Hazar, B., Mohd, I., Farediah, A., Rahman, M., & Mohd, A. (1992). Screening of tropical plants for the presence of bioactive compounds. *Pertanika*, *15*, 131-135.
- McLaughlin, J., Chang, C., & Smith, D. (1991). Bench top" bioassay for the discovery of bioactive natural products: an update. En A. Rahman, *Studies in Natural Products Chemistry* (pp. 383-409). Amsterdam: Elsevier.
- McVaugh, R. (1944). The Genus *Cnidocolus*: Generic Limits and Intrageneric Groups. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, *71*, 457-474.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., & McLaughlin, J. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, *45*, 31-34.
- Michael, A., Thompson, C., & Abramovitz, M. (1956). *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. *Science*, *123*, 464-465.
- Miller, K., & Webster, G. (1962). Systematic Position of *Cnidocolus* and *Jatropha*. *Brittonia*, *14*, 174-180.
- Miller, S., & Chamberlin, A. (1990). Enantiomerically purepolyhydroxylated acyliminium ions. Synthesis of the glucosidaseinhibitors (-)-swainsonine and (+)-castanospermine. *Journal of the American Chemical Society*, *112*, 8100-8112.
- Mitscher, L., Drake, S., Gollopudi, S., & Okwute, S. (1987). A modern look at folkloric use of anti-infective agents. *Journal of Natural Products*, *50*, 1025-1040.
- Mitscher, L., Leu, R., Bathala, M., Wu, W., Beal, J., & White, R. (1972). Antimicrobial agents from higher plants. I: Introduction, rationale and methodology. *Lloydia*, *35*, 157-166.

- Molina-Cruz, A., Cifuentes, R., Arias, C. y Bressani, R. (2000). *La chaya (Cnidoscolus aconitifolius): variedades, composición y distribución en Guatemala*. San Juan Puerto Rico: Reunión Anual del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos y Animales (PCCMCA).
- Molina-Cruz, Curley, A., & Bressani, R. (1997). Redescubriendo el valor nutritivo de las hojas de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*; *Euphorbiaceae*). *Ciencia en Acción, Universidad del Valle de Guatemala*, 1-4.
- Molyneux, R., & Ralphs, M. (1992). Plant toxins and palatability to herbivores. *Journal Rangeland Management*, 45, 13–18.
- Mothana, R., Lindequist, U., Gruenert, R., & Bednarski, P. (2009). Studies of the *in vitro* anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9, 1-11.
- Motsei, M.L., Lindsey, K.L., Van Staden, J., & Jager, A.K.( 2003). Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 235–241.
- Müeller-Riebau, M., Berger, B., & Yegen, O. (1995). Chemical composition and fungitoxic properties of phytopathogenic fungi of essential oils of selectec aromatic plants growing wild Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2262-2266.
- Muthu, C., Ayyanar, M., Raja, N., & Ignacimuthu, S. (2006). Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2, 43-51.

- Nascimento, G., Locatelli, J., Freitas, P., & Silva, G. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, *31*, 247-256.
- Natarajan, A., & Obe, G. (1986). How do *in vivo* mammalian assays compare to *in vitro* assays in their ability to detect mutagens. *Mutation Research*, *167*, 189-201.
- Nikaido, H. & Vaara, M. (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews*, *1*, 1-32.
- Niu, X., Li, S., Zhao, Q., & Lin, Z. (2002). Two novel ent-kaurane diterpenoids isolated from *Isodon xerophhilus* var. *laxiflora*. *Tetrahedron*, *43*, 661–664.
- Nostro, A., Germano, M., D'Angelo, V., Marino, A., & Cannatelli, A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, *30*, 379-384.
- O'Hare, S., & Atterwill, C. (1995). *In vitro Testing Protocols. Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Human Press.
- Oberlies, N., Rogers, L., Martin, J., & McLaughlin, J. (1998). Cytotoxic and insecticidal constituents of the unripe fruit of *Persea Americana*. *Journal of Natural Products*, *61*, 781-785.
- Oganización Panamericana de la Salud (OPS). (1999). Control Selectivo de Vectores de Malaria. Guía para el nivel local de los sistemas de salud. Washington: Organización Panamericana de la Salud.
- Oliva, M., Gallucci, N., Zygadlo, J., & Demo, M. (2007). Cytotoxic Activity of Argentinean Essential Oils on *Artemia salina*. *Pharmaceutical Biology (JournalSeek)*, *45*, 259-262.

- Ordoñez, E. (2007). Determinación de la actividad inhibidora *in vitro* de nueve plantas guatemaltecas sobre *Campylobacter jejuni*, utilizando el método de difusión en disco. Tesis de graduación para optar al Título de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (1992). Resistencia de los Vectores de Enfermedades a los Plaguicidas. Ginebra: Informe del Comité de Expertos de la OMS en Biología de Vectores y Lucha Antivectorial.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2001). Strategy to contain resistance to antimicrobial drugs. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 10, 284-294.
- Oryema, C., Bukenya-Ziraba, R., Omagor, N., & Opio, A. (2010). Medicinal plants of Erute country, Lira district, Uganda with particular reference to their conservation. *African Journal of Ecology*, 48, 285-298.
- Oyagbemi, A., Odetola, A., & Azeez, O. (2011). Phytochemical investigation and proximate analysis on the leaves of *Cnidioscolus aconitifolius*. *Journal of Medicinal Food*, 14, 322-324.
- Oyendare, B., Bakare, A. & Akinboro, A. (2009). Genotoxicity assessment of water extracts of *Ocimum gratissimum*, *Morinda lucida* and *Citrus medica* using the *Allium cepa* assay. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8, 97 – 103.
- Pacheco, R. (2004). Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* say (Diptera:culicidae). *Acta Zoológica* , 20, 141-152.

- Pan, D., Chang-Oi, H., & Chang, J. (1991). Kanmiphorin-C and D Cytotoxic diterpenes from *Euphorbia kansui*. *Phytochemistry*, *30*, 1018-1020.
- Paz, A. (2005). Búsqueda de actividad contra especies de *Campylobacter* en plantas nativas de Guatemala. Tesis Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de plantas Medicinales, MUPLAM. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Pelka, M., Danzl, C., Distler, W., & Petschelt, A. (2000). A new screening test toxicity testing of dental materials. *Journal of Dentistry*, *28*, 341-345.
- Peña, D., & Pérez, J. (2007). Metodologías Utilizadas en la Investigación de Plantas antitumorales: Descripción y Comentarios. *Universidad Científica del Sur*, 19-26.
- Peña, E., Barrueco, C., Herrera, A., & García, P. (1990). Ensayos de genotoxicidad: una alternativa a la experimentación animal. *Revista de Experimentación Animal*, *1*, 41-52.
- Perdue, G., Blomster, R., Blake, D., & Farnsworth, N. (1979). South American plants II; Tapsine isolaton and antiinflammatory activity. *Journal Pharmaceutical Sciences*, *68*, 124.
- Perez, H., Diaz, F., & Medina, J. D. (1997). Chemical investigation and in vitro antimalarial activity of *Tabebuia ochracea* ssp. *neochrysantha*. *International Journal of Pharmacology*, *35*, 227-231.
- Pérez, K. R. (2003). Comparación de la Actividad Biológica de 10 Extractos Vegetales y 5 Fármacos Utilizando Tres Bioensayos Toxicológicos. Tesis de graduación para optar al Título de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

- Poll, E. (1983). Plantas Silvestres Comestibles de Guatemala. *Revista científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC, 1*, 6-17.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine, 6*, 39-47.
- Preston, R., Au, A., Bender, M., Brewen, J., Carrano, A., Heddleja, M., et al. (1981). Mammalian *in vivo* and *in vitro* cytogenetic assays: a Report of the US EPA's. *Genotoxic Program Mutation Research, 87*, 147-188.
- Rahuman, A., Bagavan, A., Kamaraj, C., Saravanan, E., Zahir, A., & Elango, G. (2009). Efficacy of larvicidal botanical extracts against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research, 104*, 1365–1372.
- Rakshit, K., Devappa, H., & Klaus, B. (2010). Jatropha Toxicity - A Review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, 13*, 476-507.
- Rank, J. & Nielsen, M. (1998). Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutation Research, 418*, 113–119.
- Repetto, M. (2002). *Toxicología Fundamental, Métodos alternativos, Toxicidad in vitro*. España: Ediciones Díaz de Santos.
- Rex, J. H., Alexander, B. D., Andes, D., Arthington-Skaags, B., Brown, S. D., Chaturveli, B., et al.. (2000). Reference Method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. *Journal of Clinical Microbiology, 38*, 3359–3361.

- Ríos, J., Recio, M., & Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23, 127-149.
- Rojas, T. & Sander, W. (1989). *Historia de la agricultura época prehispánica siglo XVI*. México: Hispana.
- Rosengarten, F. (1982). A neglected Mayan galactagogue ixbut (*Euphorbia lancifolia*). *Journal of Ethnopharmacology*, 5, 91–112.
- Ross-Ibarra, J. & Molina-Cruz, A. (2002). The Ethnobotany of Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* ssp. *aconitifolius* Breckon): A Nutritious Maya Vegetable. *Economic Botany*, 56, 350–365.
- Ross-Ibarra, J. (2000). Ethnobotany and Genetics of Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* Mill. I.M. Johnst.): Implications for Domestication. Tesis de Maestría, University of California, Riverside.
- Salazar, L. (1991). Estudio Etnobotánico de la Chaya *Cnidoscolus chayamansa* McVaugh, en 17 Municipios del estado de Morelos. Tesis Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca.
- Samol, V., & Santizo, B. (2011). Actividad inhibitoria de extractos y aceites esenciales de especies condimentarias, alimenticias y medicinales contra *Campylobacter jejuni*. Seminario de graduación para optar al Título de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- San Martín, B., Bravo, B., & Borie, C. (2005). Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino en Chile, utilizando *E. coli* como bacteria indicadora. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 37, 117-123.

- Sánchez, A., García, K., May, F., & Peña, L. (2001). Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan Traditional Medicine Part I. Antioxidant, antimicrobial and b-glucosidase inhibition activities. *Phytomedicine*, 8, 144–151.
- Sánchez, A., Fonseca, G., Capiro, N., & Fernández, D. (2000). Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. *Revista Cubana de Farmacia*, 34, 34-43.
- Scherrer, R. & Gerhardt, P. (1971) Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. *Journal of Bacteriology*, 107, 718-735.
- Scott, B., Dorn, G., Käfer, E., & Stafford, R. (1982). *Aspergillus nidulans*: systems and results of tests for induction of mitotic segregation and mutation II. Haploid assay systems and overall response of all systems. *Mutation Research*, 98, 49-94.
- Service, M. (1983). Management of Vectors. En A. Youdeowei, & M. Service, *Pest and Vectors Management in Tropics* (pp. 265-280). London: Longman.
- Shanley, P., & Luz, L. (2003). The impacts of forest degradation on medicinal plant use and implications for health care in Eastern Amazonia. *Bioscience*, 53, 573–584.
- Shafer, D. (1982). Alternate replication bypass mechanism for sisterchromatid exchange formation. *Progress Topics in Cytogenetic*, 2, 98 – 101.
- Sheldon, J., Balick, J., & Laird, S. (1997). Medicinal plants: can utilization and conservation coexist. *Advances in Economic Botany*, 12, 1–104.
- Si, W., Gong, J., Chanas, C., Cui, S., Yu, C., Caballero, C., et al. (2006). *In vitro* assessment of antimicrobial activity of carvacrol, thymol and cinnamaldehyde towards

- Salmonella* serotypes *typhimurium* DT104: effects of pig diets and emulsification in hydrocolloids. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1282-1291.
- Singh, O., Raghavendra, K., Nanda, N., Mittal, P., & Subbarao S. (2002). Pyrethroid resistance in *Anopheles culicifacies* in Surat district, Gujarat, west India. *Malaria Research Centre*, 82, 547–550.
- Solís, P., Guerreo, N., Gattuso, S., & Cáceres, A. (2005) Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y productos Fitoterapéuticos. *Proyecto Desarrollo de Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitoterápicos*, 43-65.
- Solís, P., Wright, C., Anderson, M., Gupta, M., & Phillipson, J. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Planta Medica*, 59, 250–255.
- Standley, P. C., & Steyermark, J. (1949). Flora of Guatemala. *Fieldiana Botany*, 24, 25-170.
- Sukla, S., & Tripathi, S. (1987). Antifungal substance in the essential oil of anise (*Pimpinella anisum* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 1991-1993.
- Ticona, V., Nieva, T., Irahola, S., & Gimenez, T. (1998). Pruebas biológicas destinadas a evaluar citotoxicidad como indicadores de potenciales antitumorales. *Biofarbo*, 6, 11-16.
- Torrico, F., Gabay, J., Suárez, A., Compagnone, R. (2003). Cnidoscopus toxicology study chayamansa Mc Vaugh. *Revista de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela*, 66, 58-66.
- Valgas, V., Machado de Souza, S., Smania, E., & Smania, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 369-380.

- Vanden-Berghe, D.A., & Vlietinck, A.J. (1991). Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agents from Higher Plants. En K. Hostettmann, *Methods in Plant Biochemistry VI. Assays for Bioactivity* (pp. 47-69). London: Academic Press.
- Vanhaecke, P., Persoone, G., Claus, C., & Sorgeloos, P. (1981). Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 5, 382-387.
- Vargas, V., Córdova, P., & Alvarado, A. (2006). Determinación de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Lutzomyia peruensis* procedentes del Norte Peruano. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 23, 259-264.
- Vargas-Palominos, L., Martínez-Trujillo M., Ortiz-Castro, R., & López-Bucio, J. (2007). Efecto de metales pesados sobre el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* L. *Ciencia Nicolaita*, 49, 101-112.
- Villarreal, M., Alonso, D., & Melesio, G. (1992). Cytotoxic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Fitoterapia*, 43, 518–521.
- Walsh, T.J., & Groll, A.H. (1999). Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transplant Infectious Disease*, 1, 247–261.
- Walton, D., Acton, A., & Stich, F. (1988) Chromosome aberrations in cultured central mudminnow heart cells and Chinese hamster ovary cells exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and sediment extracts. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 89, 395-402.

- Waterhouse, D., & Norris, K. R. (1983). *Biological control: pacific prospects*. Melbourne, Australia: Inkata Press.
- Webster, D., Taschereau, P., Belland, R., Sand, C., & Rennie, R. (2008). Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *Journal of Ethnopharmacology*, *115*, 140–146.
- Webster, G. (1975). Conspectus of a New Classification of the *Euphorbiaceae*. *Taxonomy*, *24*, 593-601.
- Webster, G. (1986). Irritant plants in the spurge family (*Euphorbiaceae*). *Clinics in Dermatology*, *4*, 36 -45.
- Wong, C., Provencher, L., Porco, J., Jung, S., Wang, Y., Chen, L., et al. (1995). Synthesis and evaluation of homoazasugar as glycosidase inhibitors. *Journal of Organic Chemistry*, *60*, 1592–1501.
- World Health Organization (WHO). (2002). *Traditional Medicine Strategy 2002-2005*. Geneva: Department of Essential Drugs and Medicines Policy.
- Worbs, S., Köhler, K., Pauly, D., Avondet, M. A., & Schaer, M. (2011). *Ricinus communis*. *Intoxications in Human and Veterinary. Toxins*, *3*, 1332-1372.
- Yang, T., Liang, L., Guiming, F., Zhong, S., Ding, G., Xu, et al. (2009). Epidemiology and vector efficiency during a dengue fever outbreak in Cixi, Zhejiang province, China. *Journal of Vector Ecology*, *34*, 148–154.
- Yang Y., Lee E., Lee H, Lee D., & Ahn Y. (2004). Repellency of aromatic medicinal plant extracts and a steam distillate to *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *20*, 146-149.

Zani C., Chaves, P., Queiroz, R., De Oliveira, A., Cardoso, J., Anjos, A., et al. (1995).  
Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi*  
activity. *Phytomedicine* 2, 47-50.

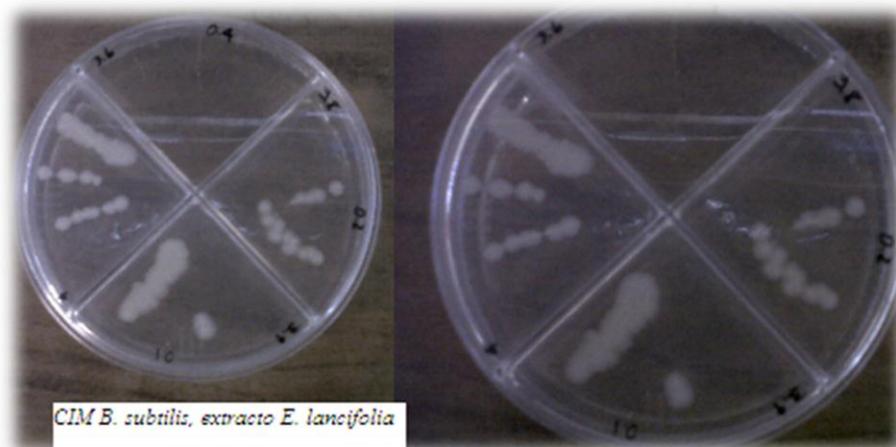
### XIII. ANEXOS

#### Anexo 1

#### Bioensayo de actividad antibiótica.



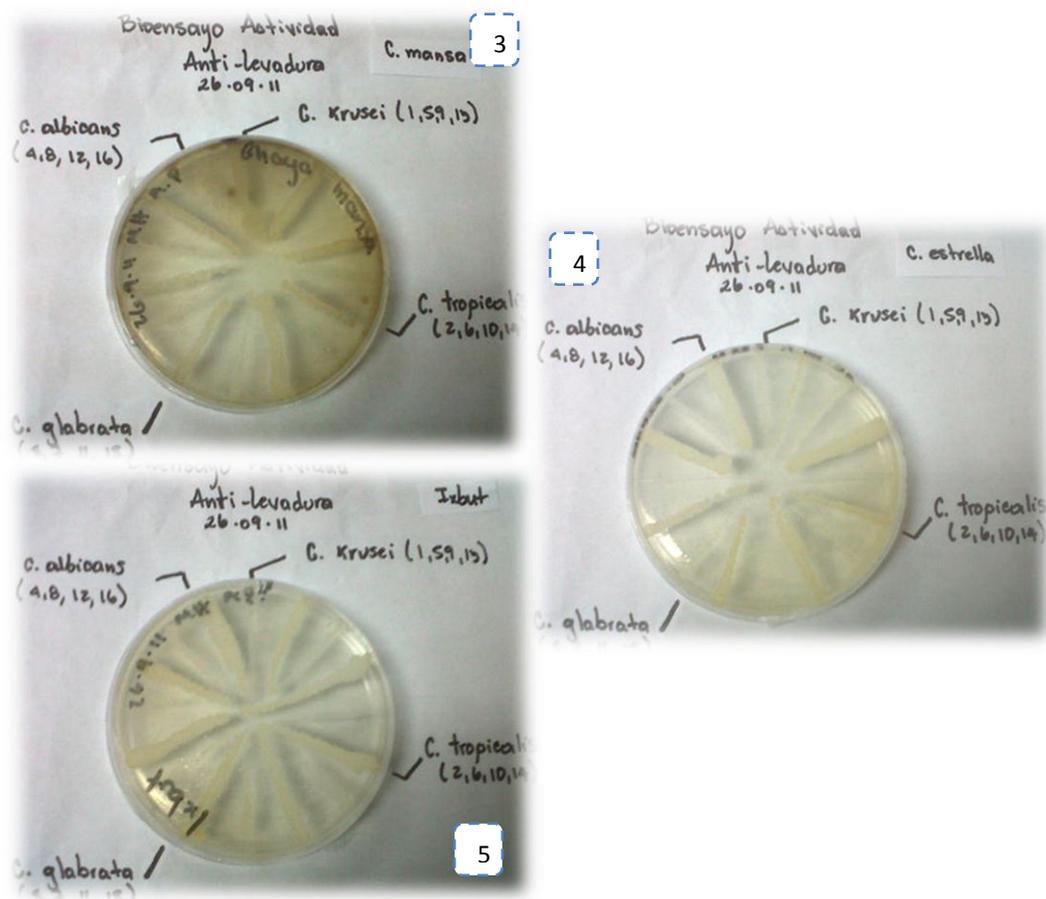
Fotografía 1. Inhibición de *B. subtilis* por el extracto de *E. lancifolia* en concentración de 1 mg/mL.



Fotografía 2. Concentración mínima inhibitoria *B. subtilis* con el extracto de *E. lancifolia* a 1 mg/mL

## Anexo 2.

### Bioensayo de levaduras.



Fotografías 3, 4 y 5. Crecimiento de levaduras denotando la actividad negativa de los extracto de *C. aconitifolius* var *mansa*, *C. aconitifolius* var *estrella* y *E. lancifolia* respectivamente.

**Anexo 3.**

**Bioensayo contra hongos miceliares.**



**Fotografía 6.** Actividad inhibitoria de *E. lancifolia* sobre *T. mentagrophytes* a concentración de 1 mg/mL

#### Anexo 4.

#### Bioensayo de *Allium cepa*, análisis de citotoxicidad

**Cuadro 1.** Estadística descriptiva (Diferencia en el crecimiento)

Tratamientos	Media	Mediana	Desviación estándar	Varianza	Número de repeticiones
Control negativo	35,520	35,700	1,5928	2,537	5
Control positivo	9,580	8,900	1,9045	3,627	5
Mansa 1 mg/ml	6,440	6,000	0,8295	0,688	5
Estrella 1 mg/ml	10,240	10,000	1,8407	3,388	5
Ixbut 1 mg/ml	21,000	22,000	4,4289	19,615	5
Mansa 0.5 mg/ml	12,600	13,000	1,2227	1,495	5
Estrella 0.5 mg/ml	10,900	11,100	0,6000	0,360	5
Ixbut 0.5 mg/ml	31,000	33,300	8,7204	76,045	5
Mansa 0.25 mg/ml	20,640	21,000	0,9915	0,983	5
Estrella 0.25 mg/ml	16,280	15,700	0,8927	0,797	5
Ixbut 0.25 mg/ml	34,340	35,000	4,2200	17,808	5
Total	18,958	15,600	10,5320	110,923	55

Fuente: Datos experimentales. Donde: Mansa: *C. aconitifolius* var mansa; Estrella: *C. aconitifolius* var estrella; Ixbut: *E. lancifolia*.

**Cuadro 2.** Análisis de varianza Prueba de efecto entre sujetos

Variable dependiente: Diferencia en el crecimiento					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Significancia
Modelo corregido	5480,462 <sup>a</sup>	10	548,046	47,341	0,000
Intercepto	19767,696	1	19767,696	1,707,551	0,000
Tratamientos	5480,462	10	548,046	47,341	0,000

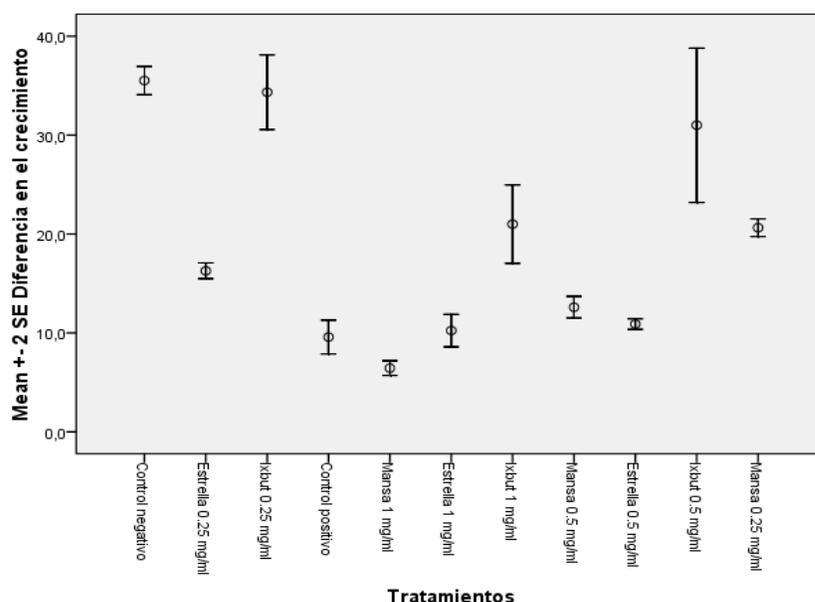
Error	509,372	44	11,577
Total	25757,530	55	
Total corregido	5989,834	54	

Fuente: Datos experimentales. R cuadrado = ,915 (R cuadrado ajustado= ,896. Existe diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.0001$ ).

**Cuadro 3.** Prueba de Dunnett t (2 colas), Diferencia en el crecimiento.

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia media (I-J)	Error estándar	Significancia
Estrella 0.25 mg/ml	Control negativo	-19,240*	2,1519	0,000
Ixbut 0.25 mg/ml	Control negativo	-1,180	2,1519	0,999
Control positivo	Control negativo	-25,940*	2,1519	0,000
Mansa 1 mg/ml	Control negativo	-29,080*	2,1519	0,000
Estrella 1 mg/ml	Control negativo	-25,280*	2,1519	0,000
Ixbut 1 mg/ml	Control negativo	-14,520*	2,1519	0,000
Mansa 0.5 mg/ml	Control negativo	-22,920*	2,1519	0,000
Estrella 0.5 mg/ml	Control negativo	-24,620*	2,1519	0,000
Ixbut 0.5 mg/ml	Control negativo	-4,520	2,1519	0,239
Mansa 0.25 mg/ml	Control negativo	-14,880*	2,1519	0,000

Fuente: Datos experimentales. La diferencia media es significativa al 0.05. Donde: Mansa: *C. aconitifolius* var mansa; Estrella: *C. aconitifolius* var estrella; Ixbut: *E. lancifolia*.



**Grafica 1.** De barras de error análisis de citotoxicidad: Se observa que los extractos de *C. aconitifolius* var *mansa* y *C. aconitifolius* var *estrella* tienen una respuesta significativa ( $p < 0.0001$ ) dependiente de la concentración frente al control negativo con excepción de *E. lancifolia* a 0.5 y 0.25mg/mL, que no presenta diferencia significativa ( $p = 0.239$  y  $p = 0.999$ , respectivamente).

- **Análisis de genotoxicidad,**

**Cuadro 4.** Estadística descriptiva, índice mitótico.

Tratamientos	Media	Mediana	Desviación Estándar	Varianza	Número de Repeticiones
Control negativo	20,460	20,500	1,4536	2,113	5
Control positivo	2,520	2,600	0,4494	0,202	5
Mansa 1 mg/mL	5,280	5,400	0,7727	0,597	5
Estrella 1 mg/mL	3,040	2,500	1,3297	1,768	5
Ixbut 1 mg/mL	17,800	17,900	1,5604	2,435	5
Mansa 0.5 mg/mL	10,980	11,100	1,6162	2,612	5
Estrella 0.5 mg/mL	7,160	7,300	0,4827	0,233	5
Mansa 0.25 mg/mL	18,220	18,600	1,5498	2,402	5
Estrella 0.25 mg/mL	9,720	9,900	1,0402	1,082	5
Total	10,576	9,000	6,5831	43,337	45

Fuente: Datos experimentales. Donde: Mansa: *C. aconitifolius* var *mansa*; Estrella: *C. aconitifolius* var *estrella*; Ixbut: *E. lancifolia*.

**Cuadro 5.** Análisis de varianza, Prueba de efecto entre sujetos.

Variable Dependiente: Índice mitótico

Origen	Grados		Media de Cuadrados	F	Significancia
	Tipo III suma de Cuadrados	libertad			
Modelo Corregido	1853,067 <sup>a</sup>	8	231,633	155,065	0,000
Intercepto	5032,907	1	5032,907	3368,746	0,000
Tratamientos	1853,067	8	231,633	155,065	0,000
Error	53,776	36	1,494		
Total	6939,750	45			
Total Corregido	1906,843	44			

Variable Dependiente: Índice mitótico

Origen	Grados		Media de Cuadrados	F	Significancia
	Tipo III de Cuadrados	suma de libertad			
Modelo Corregido	1853,067 <sup>a</sup>	8	231,633	155,065	0,000
Intercepto	5032,907	1	5032,907	3368,746	0,000
Tratamientos	1853,067	8	231,633	155,065	0,000
Error	53,776	36	1,494		
Total	6939,750	45			

Conclusión: Existe diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.0001$ ).

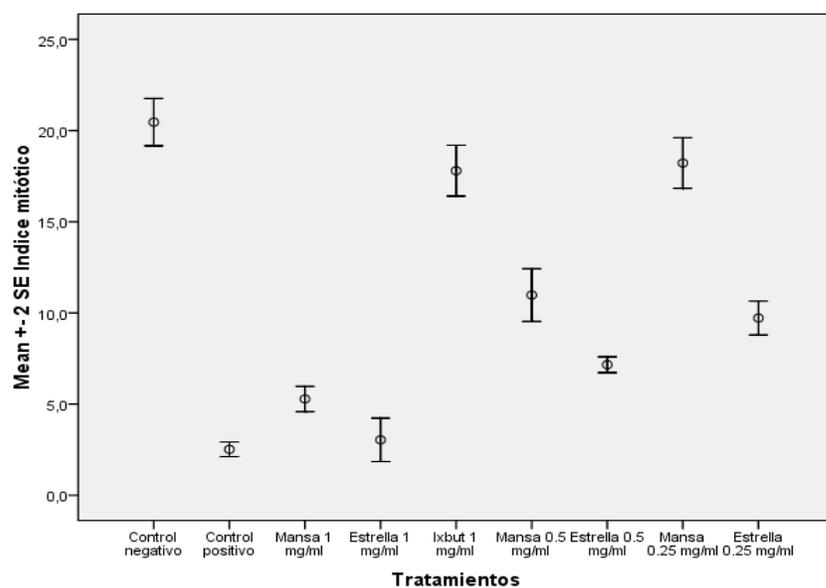
Fuente: Datos experimentales.

**Cuadro 6.** Prueba de Dunnett (2 colas) índice mitótico.

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia Media (I-J)	Error estándar	Significancia
Control positivo	Control negativo	-17,940*	0,7730	0,000
Mansa 1 mg/mL	Control negativo	-15,180*	0,7730	0,000
Estrella 1 mg/mL	Control negativo	-17,420*	0,7730	0,000
Ixbut 1 mg/mL	Control negativo	-2,660*	0,7730	0,010
Mansa 0.5 mg/mL	Control negativo	-9,480*	0,7730	0,000
Estrella 0.5 mg/mL	Control negativo	-13,300*	0,7730	0,000
Mansa 0.25 mg/mL	Control negativo	-2,240*	0,7730	0,039
Estrella 0.25 mg/mL	Control negativo	-10,740*	0,7730	0,000

\* La diferencia media es significativa al nivel de 0.05

Fuente: Datos experimentales. Donde: Mansa: *C. aconitifolius* var *mansa*; Estrella: *C. aconitifolius* var *estrella*; Ixbut: *E. lancifolia*.



**Grafica 2.** De barras de error análisis genotoxicidad: En todos los casos evaluados el valor de p es menor a 0.05, es decir que todos los extractos tienen un efecto inhibitor del índice mitótico dependiente de la concentración de los extractos etanólicos.