

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



**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD  
CITOTÓXICA DE HOJA Y FLOR DE *CORNUTIA PYRAMIDATA* Y *CORNUTIA  
GRANDIFOLIA***

**MARÍA LINDA MENDOZA PRILLWITZ  
VIVIAN STEPHANIE OLIVA FLORES**

**QUÍMICAS BIÓLOGAS**

**GUATEMALA, SEPTIEMBRE 2016**

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



**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD  
CITOTÓXICA DE HOJA Y FLOR DE *CORNUTIA PYRAMIDATA* Y *CORNUTIA  
GRANDIFOLIA***

**SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN  
PRESENTADO POR**

**MARÍA LINDA MENDOZA PRILLWITZ  
VIVIAN STEPHANIE OLIVA FLORES**

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
QUÍMICAS BIÓLOGAS**

**GUATEMALA, SEPTIEMBRE 2016**

## JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Daiel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carlos Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A DIOS**

Por darnos la fortaleza y sabiduría para culminar una de las metas de nuestra vida profesional.

### **A NUESTROS PADRES**

Por su amor incondicional, apoyo y comprensión que nos han brindado desde siempre.

### **A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**

Por brindarnos los conocimientos y enseñanzas necesarias para nuestra formación académica.

### **A M.A. Ana Margarita Paz, Lic. Armando Cáceres, Licda. Keila Guerrero y M.Sc. Alba Marina Valdés de García**

Por su orientación y asesoría para el desarrollo de la investigación

### **AL LABORATORIO DE BIOENSAYOS DEL DEPARTAMENTO DE CITOHISTOLOGÍA, EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES (LIPRONAT), EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES (FARMAYA) Y EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONCYT)**

Por permitir y proporcionar la ayuda necesaria para el desarrollo de la investigación

## **DEDICATORIA**

### **A DIOS**

Por darme la vida, acompañarme y darme las fuerzas para culminar esta etapa.

### **A MIS PADRES**

Por apoyarme incondicionalmente, por su amor y esfuerzo para poder hacer de mí una mejor persona.

### **A MIS HERMANOS**

Por su apoyo y cariño, por acompañarme en los buenos momentos y en los difíciles, han hecho mis días más felices.

### **A MI HIJO**

Por ser la persona más importante de mi vida y motivarme alcanzar mis metas para ser ejemplo en su vida.

### **A MIS TÍOS Y PRIMOS**

Por su cariño y apoyo durante las distintas etapas de mi vida.

### **A RUDY BUSTAMANTE**

Por ser una persona muy especial para mi familia, gracias por su apoyo incondicional.

*María Linda*

## **A DIOS**

Por darme la fortaleza para lograr esta meta.

## **A MIS PADRES Y ABUELOS**

Por su constante apoyo, amor y comprensión; así como su esfuerzo en hacerme una persona integral.

## **A MIS HERMANAS**

Por su cariño, orientación, y por acompañarme en todo momento.

## **A CARLOS**

Por su apoyo, amor y por siempre hacerme reír; por enseñarme que hay veces que vale la pena esperar a la persona indicada.

## **A ANNA PAOLA**

Por ser mi motivo de superación, quien me enseñó que todo es posible si existe suficiente determinación.

## **A LA FAMILIA MOCTEZUMA KATTAN**

Por adoptarme como una más de la familia.

*Vivian Stephanie*

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>Resumen</b>	<b>01</b>
<b>II.</b>	<b>Ámbito de la investigación</b>	<b>03</b>
<b>III.</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>04</b>
	A. Género <i>Cornutia</i>	04
	1. Descripción de las especies	04
	2. Hábitat y distribución geográfica	05
	3. Usos etnomédicos	05
	4. Estudios en Guatemala	05
	B. Medicina natural en Guatemala	06
	C. Estrés oxidativo en el cuerpo humano	07
	1. Antioxidantes y radicales libres	08
	2. Fuentes de antioxidantes	09
	3. Antioxidantes fitoquímicos	10
	4. Actividad antioxidante de extractos	10
	5. Métodos de determinación de la actividad antioxidante	11
	a) Método micrométrico del DPPH	12
	b) Fenoles totales	13
	D. Citotoxicidad y genotoxicidad de extractos	14
	1. Método de la <i>A. salina</i>	15
	2. Prueba de <i>A. cepa</i>	16
	3. Linfoproliferación <i>in vitro</i>	17
<b>IV.</b>	<b>Justificación</b>	<b>18</b>
<b>V.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>19</b>
	A. General	19
	B. Específicos	19
<b>VI.</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>20</b>
<b>VII.</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>21</b>
	A. Universo de trabajo	21
	B. Población	21

C.	Muestra	21
D.	Recursos	21
	1. Humanos	21
	2. Físicos	21
E.	Métodos	24
	1. Extracción continua por percolación	24
	2. Concentración usando Rotavapor	25
	3. Determinación de citotoxicidad a nauplios de <i>A. salina</i> por el método de Meyer y col (1982)	26
	4. Determinación de citotoxicidad y genotoxicidad con <i>A. cepa</i> por el método de Fiskesjö (1985)	28
	5. Linfoproliferación <i>in vitro</i>	31
	6. Determinación de la actividad antioxidante por el método micrométrico del DPPH (Blois, 1958)	32
	7. Fenoles totales (Singleton et al., 1999)	34
<b>VIII.</b>	<b>Resultados</b>	<b>37</b>
<b>IX.</b>	<b>Discusión de resultados</b>	<b>43</b>
<b>X.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>49</b>
<b>XI.</b>	<b>Recomendaciones</b>	<b>50</b>
<b>XII.</b>	<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>51</b>
<b>XIII.</b>	<b>Anexos</b>	<b>56</b>

## I. RESUMEN

El tratamiento de distintas enfermedades ha llevado a la búsqueda de nuevos componentes citotóxicos y antioxidantes, siendo las plantas medicinales las principales fuentes de dichos componentes. *Cornutia pyramidata* y *C. grandifolia* son plantas que crecen en varias regiones de Guatemala y otros países de Centro América. Se les atribuyen propiedades antirrábicas y en menor medida anticancerígenas; también son utilizadas para el tratamiento de gastritis, fiebre, asma, inflamaciones y dolores corporales.

Los ejemplares cultivados de *C. pyramidata* y *C. grandifolia* fueron recolectados en la Ecoparcela “El Kakawatal” ubicada en el cantón Chiguaxté, municipio de Samayac, departamento de Suchitepéquez. El ejemplar silvestre de *C. pyramidata* fue recolectado en Finca “El Salto” en el departamento de Escuintla, y el ejemplar silvestre de *C. grandifolia* fue recolectado en la comunidad de Sanimtacá, municipio de Cobán, departamento de Alta Verapaz. Para todas las plantas, se realizaron extractos de diclorometano y metanol para evaluar su actividad antioxidante y citotóxica.

La actividad antioxidante se evaluó por medio de las pruebas de DPPH y fenoles totales, siendo los extractos de fracciones metanólicas y el de *C. grandifolia* silvestre los que presentaron mayor actividad  $IC_{50}$  de 2.03 mg/mL para DPPH y 133.60  $\mu$ g/mg de extracto para fenoles totales, demostrándose que los compuestos antioxidantes presentes en dichas plantas tienen un carácter polar.

Para evaluar la citotoxicidad, se realizaron las pruebas de *Artemia salina*, *Allium cepa* y linfoproliferación *in vitro*. Los dos extractos de *C. grandifolia* silvestre y los extractos de diclorometano de *C. pyramidata*, tanto silvestre como cultivada, mostraron una  $CL_{50}$  entre 0.50 y 0.68 mg/mL, clasificándose como ligeramente o moderadamente tóxicos. Todos los extractos evidenciaron actividad citotóxica y

genotóxica para el ensayo de *A. cepa*, inhibiendo el crecimiento radicular en más del 65% y observándose muy pocas células en mitosis.

Se evidenció actividad inmunomoduladora en 87.5% de los ensayos de linfoproliferación, ya sea estimulando (25%) o inhibiendo (62.5%) la proliferación linfocitaria. Las plantas silvestres evidenciaron una actividad inmunomoduladora mayor al usar concanavalina A, en comparación con la fitohemaglutinina. Es necesario hacer estudios fitoquímicos para poder determinar los metabolitos secundarios asociados a la modulación inmunológica.

## II. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

Las plantas han sido empleadas por mucho tiempo como alimento y como medicamento debido a las propiedades curativas que presentan algunas de ellas. El uso cada vez más frecuente de las plantas con un fin curativo hace necesaria la investigación de las propiedades o compuestos que puedan presentar dichos organismos y los posibles riesgos que podrían representar en las personas que las usen con dicho fin.

Los bioensayos son recursos sobre los que se apoyan los investigadores para la búsqueda de los posibles riesgos y beneficios que pudieran presentar las plantas medicinales. El propósito de éstos es evaluar el potencial de una sustancia extraída o droga vegetal a partir de las respuestas producidas en organismos biológicos. Dentro de este marco, se realizaron pruebas para poder determinar la actividad antioxidante y citotóxica que pudieran presentar los extractos de diclorometano y metanol de hoja y flor de *Cornutia pyramidata* L. y *Cornutia grandifolia* Shauer in DC. Dichas pruebas se realizaron con la ayuda del Laboratorio de Productos Naturales FARMAYA, el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) y el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología. Esta investigación forma parte del proyecto FODECYT 14-2013 “Actividad citotóxica de fracciones orgánicas de cuatro especies nativas de Guatemala con potencial actividad anticáncer identificada por estudios previos de tamizaje”, el cual es financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT).

### III. ANTECEDENTES

#### A. Género *Cornutia*

Árboles o arbustos de hasta 10 m de altura y con hojas aromáticas. Sus tallos y ramas son cuadrados y cuando jóvenes son densamente pubescentes (pelos cortos). Las hojas nacen en pares que salen de un mismo nudo, pero en lados opuestos de la rama, están cubiertas por pequeños pelos, son enteras, con forma ovada e elíptica, el extremo terminado en una punta fina y el margen entero o con dientes pequeños. Sus flores nacen en inflorescencias terminales racimosas, cubiertas por pequeños pelos y son de color azul a morado. Los frutos son muy pequeños, globosos, carnosos y azulados. La reproducción se da a través de semillas.

Es un género con posiblemente 10 especies, todas de América tropical, con abundantes flores azules o púrpuras. Se conocen dos especies más del sur de Centro América (Standley, Williams & Gibson, 1970).

#### 1. Descripción de las especies

El nombre científico de las dos especies en estudio es *C. pyramidata* y *C. grandifolia*. Cabe señalar que en la Flora de Guatemala el género *Cornutia* se divide en dos especies, *C. pyramidata* y *C. grandifolia*, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, en la Flora de Nicaragua, ambas especies se clasifican como una misma, *C. pyramidata* (Standley et al., 1970).

Debido a que hay un amplio rango de variación tanto en *C. grandifolia* como en *C. pyramidata*, algunas formas pueden parecer bastante diferentes. Sin embargo, no siempre es fácil separar incluso estos dos taxones ya que los frutos son idénticos. Una considerable variación en la longitud del cáliz y el ancho de la corola se ve a veces en una sola planta. El fin de describir por separado todos los representantes intermedios de dichas plantas ha resultado en la creación de especies y

variedades separadas sólo por características inconstantes y mal definidas (Standley et al., 1970).

## **2. Hábitat y distribución geográfica**

Estas plantas crecen entre matorrales en zonas húmedas o en bosques densos de segundo crecimiento a una altitud entre los 100 y 1300 - 1500 m sobre el nivel del mar; ha sido reportada en Alta Verapaz (Cahabón), Chimaltenango, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Guatemala, Izabal, Petén, Quetzaltenango Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Sololá, Suchitepéquez, Zacapa; así como también en México, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá e Indias Occidentales (Standley et al., 1970).

## **3. Usos etnomédicos**

Comúnmente se les atribuyen propiedades antirrábicas y en menor medida anticancerígenos; también son usadas en el tratamiento contra gastritis, fiebre, asma y dolores corporales. La decocción de su raíz es empleada en crisis nerviosas (Cates et al., 2013).

## **4. Estudios en Guatemala**

Estudios preliminares realizados en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia han demostrado que esta especie posee actividad biocida. Trabajos de tesis realizados en la Escuela de Química Biológica evaluaron la actividad del extracto etanólico de *C. pyramidata* contra *Sporothrix schenckii* (Gaitán, 2005) y la actividad moduladora *in vitro* sobre la vía clásica y la vía alterna del sistema de complemento, resultando en ambos casos inactivo (Guerrero Gutiérrez, 2009a). Otro trabajo de tesis evaluó la actividad de extractos de diclorometano y metanol de *C. grandifolia* contra *Campylobacter jejuni*, encontrándose actividad biocida negativa en ambos casos (Samol Juárez & Santizo Paz, 2011).

En la Escuela de Química Farmacéutica se determinó la actividad biocida del extracto etanólico y sus particiones (hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y

acuosa) de hojas de *Cornutia pyramidata*, en la cual al menos una partición presentó actividad biocida positiva. El extracto etanólico presentó actividad contra *Mycobacterium smegmatis* y *Staphylococcus aureus*; la partición de acetato de etilo presentó actividad contra *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *M. smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*; las particiones clorofórmica y acuosa presentaron actividad únicamente contra *S. aureus*. En el caso de *Aspergillus flavus*, todas las particiones del extracto presentaron actividad biocida. El extracto etanólico, así como la partición acuosa y la de acetato de etilo, presentaron actividad citotóxica contra *Artemia salina*, propiedad vinculada con la presencia de compuestos con actividad antitumoral. También se realizó un tamizaje fitoquímico en el cual se identificaron los metabolitos secundarios de alcaloides, cumarinas, antocianinas, saponinas, flavonoides y principios amargos (Molina, 2005).

Un estudio realizado por la Brigham Young University, realizado en conjunto con la Universidad de San Carlos de Guatemala, concluyó que los extractos de acetona y metanol de *C. pyramidata* no eran activos contra cáncer de seno, cérvix, piel y lengua. De igual manera, dichos extractos no mostraron actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Candida albicans* (Cates et al., 2013).

## **B. Medicina natural en Guatemala**

Los productos naturales han sido una fuente fértil de conocimiento en el tratamiento contra múltiples enfermedades, incluyendo el cáncer. De ellos se han podido obtener muchas moléculas que podrían poseer algún tipo de actividad citotóxica contra líneas celulares malignas. Se han encontrado aproximadamente más de unas mil especies de plantas que poseen propiedades anticancerígenas significativas (Mukherjee, Basu, Sarkar, & Ghosh, 2001).

En los últimos años, los bioensayos han cobrado interés en el campo de la investigación para evaluar los potenciales efectos fitotóxicos, antioxidantes,

citotóxicos y genotóxicos de diferentes compuestos como los extractos de origen natural que se utilizan ampliamente para tratar diferentes enfermedades como la hipertensión, dolores musculares e incluso cáncer (Muñoz Solarte & Guerrero Pepinosa, 2013).

Aprovechando que Guatemala es un país rico en especies vegetales usadas en medicina popular, estas deben ser objeto de investigación, para análisis químico preliminar e identificar el tipo de compuestos presentes y la evaluación de sus efectos potenciales.

### **C. Estrés oxidativo en el cuerpo humano**

El proceso de oxidación en el cuerpo humano, es un proceso que puede causar daños en las membranas celulares y otras estructuras, incluidas las proteínas celulares, lípidos y ADN. El metabolismo del oxígeno crea moléculas inestables llamadas radicales libres, las cuales roban electrones a otras moléculas, causando daño al ADN y otras células. El organismo puede hacerse cargo de algunos radicales libres, incluso necesita de algunos para funcionar efectivamente y en algunos casos las especies reactivas de oxígeno pueden resultar beneficiosas ya que son utilizadas por el sistema inmunitario como un medio para atacar y matar a los patógenos, a través de la fagocitosis. Sin embargo, el daño es causado por un desequilibrio por la súper producción de estos radicales, los cuales pueden causar ciertas enfermedades incluidas enfermedades coronarias, hepáticas y malignidades de distinto origen, tales como cáncer oral, de esófago, estómago e intestino.

El desequilibrio es llamado estrés oxidativo y se da entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS o ERO) y la incapacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. En términos químicos, el estrés oxidativo es un gran aumento en la reducción del potencial celular o una gran disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión. El estrés oxidativo severo puede

causar la muerte celular y aún una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis.

La fuente más importante de oxígeno reactivo en condiciones normales en organismos aeróbicos es probablemente la pérdida de oxígeno activado de las mitocondrias durante el funcionamiento normal de la respiración oxidativa. Algunas de las menos reactivas de estas especies (como el superóxido) pueden ser convertidas por una reacción redox con metales de transición en quinonas, especie radical más agresiva que puede causar extenso daño celular (Avello & Suwalsky, 2006).

Ante el peligro que representa el daño oxidativo, las células se encuentran habilitadas con mecanismos de protección: preventivos, secuestradores y reparadores de este deterioro. Los antioxidantes celulares mejor estudiados son las enzimas superóxido-dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa. Antioxidantes enzimáticos menos estudiados (pero probablemente muy importantes) son la peroxirredoxina y la sulfirredoxina. Otros enzimas que tienen propiedades antioxidantes (aunque esta no es su función primordial) incluyen la paraoxonasa, la glutatión S-transferasa y la aldehído deshidrogenasa (Avello & Suwalsky, 2006).

### **1. Antioxidantes y radicales libres**

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo

lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos.

Estas acciones se dan constantemente en las células de nuestro cuerpo, proceso que debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante. Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones en nuestra sangre, los que son captados por los radicales libres (Finkel & Holbrook, 2000).

## **2. Fuentes de antioxidantes**

Existen fuentes exógenas y endógenas, los antioxidantes exógenos provienen de la dieta y dentro de este grupo se incluyen la vitamina E, vitamina C y los carotenoides. La vitamina C constituye el antioxidante hidrosoluble más abundante en la sangre, mientras que la vitamina E es el antioxidante lipofílico mayoritario. El selenio, el más tóxico de los minerales incluidos en nuestra dieta, actúa junto con la vitamina E como antioxidante. La vitamina E se encuentra presente en aceites vegetales, aceites de semilla, germen de trigo, maní, carnes, pollo, pescados y algunas verduras y frutas, en tanto la vitamina C se puede encontrar en frutas y verduras. Los carotenoides son compuestos coloreados tales como los betacarotenos, presentes en verduras y frutas amarillas y anaranjadas y en verduras verdes oscuras, los alfacarotenos en la zanahoria, los licopenos en el tomate, las luteínas y xantinas en verduras de hojas verdes como el brócoli y las beta criptoxantinas en frutas cítricas (Lindsay, 1999).

Recientemente se han descubierto en algunos alimentos otros antioxidantes no nutrientes, los compuestos fenólicos. Algunas fuentes son los frijoles (isoflavonas), cítricos (flavonoides), cebolla (quercetina) y aceitunas (polifenoles). También se han encontrado algunos antioxidantes fenólicos en el café, vino tinto y té. Por esta razón, la forma de suplir los antioxidantes para proteger al organismo del efecto oxidativo producido por los radicales libres es el consumo de alimentos ricos en

vitamina E, vitamina C, carotenoides y otras sustancias que tienen función antioxidante, tales como los compuestos fenólicos (Avello & Suwalsky, 2006).

### **3. Antioxidantes fitoquímicos**

Durante muchos años las plantas han sido usadas en muchos campos, incluyendo medicina, nutrición, saborizantes, bebidas, repelentes, fragancias, cosméticos, cigarrillos y otros propósitos industriales. Desde épocas remotas las plantas han sido la base para casi todas las terapias medicinales, hasta cuando las drogas sintéticas se desarrollaron en el siglo XIX (Djeridane et al., 2006), ya que estas contienen una amplia variedad de moléculas con actividad antioxidante, como flavonoides, antocianinas, carotenoides, vitaminas, metabolitos endógenos y productos naturales con actividad antioxidante. Éstos son llamados antioxidantes no nutrientes, que carecen de valor nutricional, e incluyen fitoquímicos como licopenos, antocianinas, taninos, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas, xantonas, ácidos fenólicos, flavones, flavonoles, catequinas y proantocianinas, los cuales debido a sus propiedades redox pueden actuar como donadores de hidrógenos y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas (Marwah et al., 2007).

### **4. Actividad antioxidante de extractos**

En los últimos días se ha visto un aumento en la búsqueda de nuevas fuentes de sustancias antioxidantes, preferiblemente de origen vegetal, que puedan disminuir o eliminar las reacciones de degradación oxidativa en sistemas biológicos y alimenticios. Esto se ha convertido en un reto, no solo con el objeto de aprovechar de modo razonable los recursos naturales, sino que también ayudar a mejorar las condiciones de vida. Las ventajas del empleo de las plantas son que, junto a sus principios activos existen en muchos casos otros constituyentes de acción sinérgica, que potencian su acción y la hacen más completa y duradera que el principio o principios activos aislados (Puertas, Ríos & Sáez, 2009).

## 5. Métodos de determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. En la medición de una muestra oxidante, pueden usarse intermediarios o productos finales para valorar la actividad antioxidante. Con base a las reacciones químicas, la gran mayoría de los ensayos para determinar de capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías: Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET) (Anexo 1) (Huang, Ou & Prior, 2005).

Los ensayos basados en la transferencia de electrones (ET) involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción. La mayoría de los ensayos basados en HAT monitorean una reacción cinética competitiva, generalmente están compuestos de un generador de radical libre sintético, una prueba molecular oxidable y un antioxidante. Ambos ensayos fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra (Anexo 2) (Huang et al., 2005).

En los últimos años se han adoptado un amplio rango de ensayos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales. Usualmente los ensayos antioxidantes *in vitro* utilizan un captador de radicales libres y son relativamente sencillos de realizar. Entre los ensayos de captación de radicales libres, el método DPPH es el más rápido, simple (no incluye muchos pasos) y de menor costo en comparación con otros modelos. Por otro lado, el ensayo de decoloración ABTS se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2012). Por lo anterior, estos dos métodos son los más utilizados.

### **a) Método micrométrico del DPPH**

Ensayo del DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) método propuesto por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH para aceptar un átomo de hidrógeno, proveniente de una molécula de cisteína.

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres (Anexo 3). La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes.

Después de aproximadamente tres décadas este ensayo comenzó a utilizarse rutinariamente para la caracterización de las propiedades antioxidantes. El procedimiento original para el ensayo DPPH ha sido adoptado por muchos laboratorios y a pesar que existen modificaciones a conveniencia, una revisión detallada de la literatura ha revelado que la mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de reacción total de 120 min requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox (Ojha, Mishra & Chaudhury, 2012).

Los resultados del ensayo DPPH se han presentado de diferentes maneras. La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria ( $IC_{50}$ ), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor  $IC_{50}$  cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH usado (Deng, Cheng & Yang, 2011).

El ensayo DPPH tiene algunas desventajas que limitan su aplicación, entre éstas se encuentran:

- La diferencia en el mecanismo de reacción que normalmente ocurre entre antioxidante y radicales peroxilo.
- DPPH es un radical del nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo, reaccionan lentamente o son inertes al DPPH. Esto se evidencia en el tiempo necesario para determinar el IC<sub>50</sub> que van en un rango de 1.15 min (Ácido ascórbico) a 103 min (Rutina).
- La reacción cinética entre el DPPH y los antioxidantes no es lineal con la concentración de DPPH, por lo cual es arbitrario medir la capacidad antioxidante usando IC<sub>50</sub>.
- La reacción de DPPH con eugenol es reversible (Garrido & Parada, 2008), lo que podría resultar en falsas lecturas (bajas) para la capacidad antioxidante de muestras que contengan eugenol y otros fenoles que guarden un tipo de estructura similar.

#### **b) Fenoles totales**

El ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C) es un método comúnmente utilizado en el área de agroquímica e industrias alimenticias, por su simplicidad, por la disponibilidad comercial del reactivo y por ser un procedimiento ya estandarizado (Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventos, 1999). Inicialmente, fue aplicado al análisis de proteínas tomando como ventaja la actividad del reactivo frente al residuo de proteína, tirosina (que contiene un grupo fenol). Muchos años después este ensayo se extendió al análisis de fenoles totales en vino y desde entonces se le ha encontrado muchas aplicaciones.

El reactivo de F-C utiliza un mecanismo de reacción de oxidación/reducción que no es específico para fenoles. De hecho, el ensayo de F-C mide la capacidad para reducir el reactivo de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico a un complejo azul que

es monitoreado espectrofotométricamente, donde el molibdeno es reducido en el complejo y se da la reacción de transferencia de electrones entre el molibdeno(IV) y el reductor (Anexo 4) (Huang et al., 2005). El método implica la oxidación de fenoles en solución alcalina por el hetero-polianiónmolibdotungstofosfórico amarillo y la medición colorimétrica del molibdotungstofosfato azul resultante. Este complejo azul tiene su máxima absorción dependiendo de su composición fenólica, además del pH de las soluciones implicadas (Cicco, Lanorte, Paraggio, Viggiano & Lattanzio, 2009).

En el ensayo F-C original, se usa el buffer de carbonato para ajustar el pH y el punto final de reacción se alcanza a los 120 min aproximadamente a temperatura ambiente. Aunque es un tiempo demasiado extenso y dificulta la implementación de un análisis de rutina, aún es utilizado por algunos investigadores (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho & Fett, 2005). En diferentes trabajos se ha variado concentración del reactivo, alcalinidad y temperatura, buscando una reducción significativa del tiempo necesario para llegar a un estado estacionario. Magalhães, Santos, Segundo, Reis & Lima (2010) adaptaron el método, en el cual se varía la alcalinidad al reemplazar el buffer de carbonato por una solución de hidróxido de sodio logrando disminuir el tiempo de reacción a 4 min y conseguir resultados altamente confiables. Al final se debe tener muy presente la concentración alcohólica en la mezcla, puesto que según Singleton et al. (1999) el incluir disolventes diferentes al agua en las muestras, algunas veces puede interferir la formación de la solución azul.

#### **D. Citotoxicidad y genotoxicidad de extractos**

Citotoxicidad es un concepto que se puede aplicar en cualquiera de las siguientes situaciones: muerte celular o alteración de su metabolismo. Existen ensayos útiles para la determinación de la citotoxicidad que son ampliamente empleados por su bajo costo, fácil cuantificación y reproducibilidad. Mediante este tipo de experimentos es posible determinar el potencial citotóxico de compuestos de

interés, que podrían tener futuras aplicaciones terapéuticas (Freyre, Estrada & Bolaños, 2009).

Los modelos experimentales empleados para valorar la toxicidad de compuestos químicos se fundamentan en el sustrato biológico y en los indicadores de toxicidad. El sustrato es el material orgánico sobre el que se aplica una sustancia exógena, mientras que los indicadores de toxicidad son los parámetros que permiten determinar las alteraciones producidas en la estructura o fisiología de los componentes del sustrato de ensayo (Freyre et al., 2009).

El potencial genotóxico *in vitro* de compuestos químicos ha sido frecuentemente evaluado al analizar en forma directa el material cromosómico y determinar las tasas de inducción de aberraciones cromosómicas. Las pruebas de daño primario en el ADN miden típicamente la respuesta secundaria producida por las lesiones del mismo, tales como la estimulación de la reparación del ADN, recombinación somática entre homólogos (cromátides hermanas) y quiebras en la hebra del ADN (Ascarrunz, Olivares, Taboada & Romero, 1999).

### **1. Método de *Artemia salina***

Uno de los biomodelos más utilizados en las etapas preliminares de la investigación fitoquímica, es el bioensayo de letalidad frente a *A. salina*, desarrollado por Meyer y colaboradores (1982). El procedimiento consiste en exponer compuestos activos y/o extractos de plantas a nauplios de *A. salina*, para determinar valores de concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), expresada en g/mL. Sin embargo, los valores obtenidos de CL<sub>50</sub> no advierten una actividad fisiológica o biológica en particular; son indicadores de toxicidad a nivel celular que pueden orientar investigaciones más específicas (Sánchez & Neira, 2005).

*Artemia salina* es un organismo fácil de cultivar y manipular en laboratorio, es sensible a una gran variedad de tóxicos, y genera resultados confiables en al ser una alternativa poco costosa, sencilla y rápida. Este bioensayo es aplicable a

compuestos con estructuras y modos de actividad diversos, lo que le otorga la característica de ser de amplio espectro, de ahí que sea usado como método de análisis para detectar residuos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos y compuestos de tipo morfínico, entre otros (Sánchez & Neira, 2005). El ensayo de letalidad mediante *A. salina* consiste en exponer las larvas de dicho crustáceo a la muestra en solución salina, siendo la letalidad evaluada luego de 24 horas (Krishnaraju et al., 2006).

## **2. Prueba de *Allium cepa***

Entre los organismos de prueba usados para ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad se incluyen las plantas superiores como la cebolla (*A. cepa*), la cual es reconocida como excelente bioindicador de genotoxicidad y efectos mutagénicos. Además de las ventajas en cuanto a costos, disponibilidad y sensibilidad, cabe mencionar que las características cromosomales de esta especie favorecen la evaluación de aberraciones cromosómicas, lo cual puede ser útil en una interpretación de los posibles mecanismos implicados en la genotoxicidad. Las aberraciones cromosómicas se caracterizan por cambios en la estructura cromosómica o en el número total de cromosomas; esto puede ocurrir espontáneamente o como resultado de la exposición a agentes físicos o químicos. Dichas aberraciones se pueden producir a través de mecanismos clastogénicos y aneugénicos. Los primeros se caracterizan por la inducción de rupturas cromosómicas durante la división de la estructura celular, mientras que los segundos comprenden la alteración de estructuras celulares, tales como el huso mitótico, lo cual conlleva pérdidas cromosomales (Freyre et al., 2009).

Las plantas vasculares son ampliamente reconocidas como excelentes modelos genéticos para evaluar y detectar compuestos con potencial citotóxico y genotóxico. *Allium cepa* es usada para evaluar daños del ADN, como alteraciones cromosómicas y mitóticas. Las células de los meristemos apicales de cebolla muestran fácilmente un amplio rango de alteraciones citológicas, lo que constituye el trabajo con raíces de esa especie vegetal en material biológico sensible para

detectar sustancias potencialmente peligrosas tanto para la salud humana como para el medio ambiente en general. La determinación de dichos efectos se realiza a partir de la observación del crecimiento, el flujo del ciclo celular y las mutaciones cromosómicas del ápice radical de la cebolla (Muñoz Solarte & Guerrero Pepinosa, 2013).

### **3. Linfoproliferación *in vitro***

El ensayo de proliferación de linfocitos o linfoproliferación *in vitro* en respuesta a un mitógeno o a un antígeno específico, es uno de los métodos utilizados rutinariamente en medicina para evaluar la inmunidad mediada por células. Por lo regular, en este ensayo se utilizan linfocitos frescos y la técnica para determinar la proliferación celular es la incorporación de un isótopo radioactivo, generalmente la timidinatritiada ( $H^3$ ). Esta técnica es muy sensible cuando se utilizan isótopos radioactivos, pero tiene la desventaja que éstos contaminan el ambiente, además se requiere de equipo costoso, de instalaciones particulares y de un permiso especial para manipular material radioactivo. Por otra parte, la técnica colorimétrica rápida que emplea el colorante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 bromuro difeniltetrazolio (MTT), que es reducido por deshidrogenasas mitocondriales de células viables a formazán púrpura, se ha utilizado en una variedad de ensayos que incluyen la cuantificación de linfocinas, citotoxicidad, proliferación y activación celular (Bautista Garfias, Acosta García & Toledo García, 2000).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Las plantas han sido usadas desde tiempos ancestrales debido a sus propiedades curativas. El avance de la medicina y la creciente demanda de medicamentos novedosos han incrementado el campo de investigación acerca de los posibles compuestos beneficiosos que podrían encontrarse en organismos como las plantas. El creciente número de personas que solicitan un tratamiento contra enfermedades como el cáncer hace que se desarrollen más investigaciones acerca de nuevas propuestas terapéuticas.

Dada la necesidad de encontrar nuevos compuestos bioactivos, la medicina se ha volcado a la búsqueda de los principios activos presentes en plantas usadas comúnmente en la medicina tradicional, con la esperanza de encontrar sustancias eficaces contra múltiples enfermedades. El foco de muchas de las investigaciones en los últimos años ha sido la búsqueda de compuestos de origen vegetal que presenten una baja toxicidad y que sean efectivos en el tratamiento contra el cáncer.

Guatemala es un país con una amplia diversidad vegetal, por lo que la búsqueda de sustancias con un potencial terapéutico ha aumentado enormemente. La medicina tradicional ha hecho uso de plantas nativas durante mucho tiempo, muchas de ellas en base a conocimiento empírico. *Cornutia pyramidata* y *C. grandifolia* son plantas con actividad biocida e inmunomoduladora demostrada, por lo que es importante investigar la posible actividad antioxidante y/o citotóxica que pudieran presentar dichas plantas, usando un disolvente polar (metanol) y uno apolar (diclorometano).

## V. OBJETIVOS

### A. General

Evaluar la capacidad tóxica y antioxidante de fracciones de metanol y diclorometano de las plantas nativas de Guatemala, *C. pyramidata* y *C. grandifolia*.

### B. Específicos

1. Determinar la actividad citotóxica general por inhibición de nauplios de *A. salina*.
2. Evaluar la actividad genotóxica por medio del ensayo de *A. cepa*.
3. Evaluar la capacidad de multiplicación de los linfocitos por medio del ensayo de linfoproliferación *in vitro*.
4. Investigar la actividad antioxidante de las fracciones que presenten actividad citotóxica por las técnicas de DPPH y fenoles totales por métodos micrométricos.

## VI. HIPÓTESIS

Al menos uno de los extractos de *C. pyramidata* y *C. grandifolia* posee efecto citotóxico y antioxidante.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo de Trabajo

Plantas de las especies *C. grandifolia* y *C. pyramidata* nativas de Guatemala.

### B. Población

Dos plantas de la especie *C. grandifolia*, una cultivada y otra silvestre. Dos plantas de la especie *C. pyramidata*, una cultivada y otra silvestre. Las cuatro plantas provenientes de Guatemala.

### C. Muestra

Extractos metanólicos de *C. grandifolia* y *C. pyramidata*, cultivadas y silvestres y extractos de diclorometano de *C. grandifolia* y *C. pyramidata*, cultivadas y silvestres.

### D. Recursos

#### 1. Humanos

##### a) Investigadores

- Br. María Linda Mendoza Prillwitz
- Br. Vivian Stephanie Oliva Flores

##### b) Asesores

- MA. Ana Margarita Paz, Q.B.
- Lic. Armando Cáceres, Q.B.

#### 2. Físicos

##### a) Materiales

- Algodón
- Balón aforado de 25 mL
- Balón aforado de 10 mL

- Balón aforado de 100 mL
- Balón aforado de 1000 mL
- Beakers
- Bisturí
- Bulbos
- Bulbos de *A. cepa*
- Cámara de Neubauer
- Cubreobjetos
- Embudo
- Erlenmeyers
- Espátula
- Extractos de planta
- Frascos de vidrio ámbar y tapón de rosca con capacidad de 25 a 50 mL y con capacidad de 100 a 250 mL
- Gradilla
- Huevos de *A. salina*
- Jarra con candela
- Marcador indeleble
- Microplacas de fondo plano de 96 pozos
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Pecera para cultivo
- Percolador de acero inoxidable
- Pipetas automáticas de volumen ajustable
- Pipetas pasteur
- Placas estériles de 96 pozos de fondo plano con tapadera
- Portaobjetos
- Programa de computadora Finney (DOS)
- Puntas amarillas de 200  $\mu$ L
- Puntas azules de 1000  $\mu$ L
- Sal de mar

- Tubos cónicos de 50 mL
- Tubos de ensayo
- Tubos de ensayo con capacidad de 10 mL
- Tubos Vacutainer con EDTA de 5 mL
- Vaso para precipitar de 2 L
- Vaso para precipitar de 500 mL
- Vidrio de reloj

b) Equipo

- Balanza analítica
- Bomba de oxígeno para pecera
- Campana de flujo laminar
- Centrífuga
- Espectrofotómetro
- Estereoscopio
- Estufa
- Incubadora a 37°C
- Lámpara de luz blanca
- Lector ELISA
- Mechero
- Microscopio
- Potenciómetro
- Refrigeradora
- Rotavapor
- Sonificador
- Vortex

c) Reactivos

- Acido gálico ( $C_7H_6O_5$ ) en solución 1 mg/mL
- Agua destilada
- Diclorometano

- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)
- Furosemida®
- Gelatina
- Histopaque
- Lectinas de Con A y PHA (Concanavalina A y Fitohemaglutinina)
- L-Glutamina 200 mM
- Medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute)
- Metanol
- Orceína acética
- Paraquat®
- PBS (solución amortiguadora de fosfatos)
- PMS (Metosulfato de fenacina)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- RPMI-FBS
- SDS (dodecil sulfato sódico)
- Solución de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 10% p/v
- XTT (Sal de Tetrazolio)

## **E. Métodos**

### **1. Extracción continua por percolación**

#### a) Preparación del material

- En un percolador previamente limpio y seco se colocó un poco de algodón en la parte inferior y papel filtro cortado de acuerdo al diámetro del percolador
- Se pesaron 200 g de material vegetal previamente tamizado
- Se humedeció el material vegetal con el disolvente adecuado para la extracción utilizando un beaker
- Se transfirió el material al percolador en 4 o más etapas, distribuyendo uniformemente cada porción, comprimiéndola adecuadamente, procurando que

no quedaran espacios libres en el interior de la masa del vegetal y se agregó disolvente hasta cubrir el material vegetal

- Se cubrió la superficie (con papel aluminio) y añadió disolvente con la llave de salida abierta. Cuando el líquido extractivo comenzó a gotear por la llave de salida, se cerró y añadió más menstruo hasta cubrir el material vegetal y se tapó el percolador
- Se dejó reposar el tiempo necesario para llevar a cabo la extracción, la cual dependió del material vegetal (aproximadamente 24-48 horas)
- Se abrió la llave de la parte inferior y se dejó gotear el líquido a una velocidad constante
- Se recogió el líquido en un erlenmeyer y añadió suficiente disolvente extra hasta que se obtuvo el volumen de disolvente agregado al inicio
- Se presionó fuertemente el material sólido que quedó y se añadió el líquido recolectado al percolado obtenido anteriormente
- Se dejó en reposo durante 15 a 20 días a temperatura ambiente, se decantó y filtró (Medinilla, 1996; Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002).

## **2. Concentración usando Rotavapor**

### a) Preparación del rotavapor

- Se verificó que estén conectadas todas las conexiones eléctricas
- Se aplicó vaselina al vástago rotatorio, a todas las llaves y espacios esmerilados
- Se colocó el balón colector y fijó con la llave respectiva
- Se revisó el nivel de agua del baño
- Se encendió el baño y mantuvo la temperatura no mayor de 50°C
- Se revisó que la llave del refrigerante estuviera cerrada
- Se mantuvo el sistema de refrigeración a baja temperatura, con recambio periódico de los hielos
- Se colocó el balón con la muestra y se sujetó al vástago con la llave correspondiente

- Se encendió el botón que permite girar el balón que contenía la muestra a una revolución adecuada (Genaro, 2003).

### **3. Determinación de citotoxicidad a nauplios de *A. salina* por el método de Meyer y col (1982)**

#### a) Preparación de agua de mar

- En un vaso para precipitar, se disolvieron 35 g de sal de mar (procedente de salineras, no se utilizó sal comercial, ni grado reactivo) en un litro de agua destilada.
- Se hizo una marca en el vaso para indicar el volumen.
- Se hirvió por 30 min y se completó el volumen que se evaporó según la marca con agua destilada.
- Se filtró y refrigeró hasta el momento de usar, pues la solución es estable por un mes a temperatura de 6-8°C.

#### b) Cultivo de *A. salina*

- Se colocaron 200 mL de agua de mar en un vaso de precipitar de 500 mL y se aireó por 30 min.
- Se forró la tercera parte de la pecera con papel aluminio, para crear el área oscura.
- Se colocaron 200 mL de agua de mar en la pecera.
- Se pesaron 40 mg de huevos de *A. salina*.
- Se colocó la pecera en un lugar estable, en el cual no haya movimiento, y se agregaron 40 mg de *A. salina* en el área oscura.
- La pecera no se movió después de agregados los huevos, ya que estos podrían pasar al área iluminada (sin forrar).
- Se colocó la lámpara de luz blanca a una distancia de 30 cm del área iluminada (sin forrar).

- Se incubó por 24 h a temperatura ambiente. Los nauplios (larvas) pasaron al área iluminada de la pecera al eclosionar. Los nauplios de no más de 18 horas de nacimiento fueron utilizados para la prueba de toxicidad.

c) Preparación de solución a ensayar

- Extracto: se pesó 1 mg del extracto a ensayar en un tubo de ensayo y se disolvió con 1 mL de agua destilada. Se preparó la cantidad requerida de esta solución a ensayar, manteniendo la relación 1:1. Se sonicó por una hora para optimizar la solubilidad.

d) Determinación de la citotoxicidad

- Control positivo: se colocó 1 mL de furosemida en un tubo de ensayo, se agregó 1 mL de agua destilada y se mezcló. Se agregaron en un pozo de la microplaca 100  $\mu$ L de agua de mar con 10-15 nauplios. Se agregaron 100  $\mu$ L de la solución de furosemida, para un volumen total de 200  $\mu$ L y se realizó por triplicado.
- Control negativo: se agregaron en un pozo de la microplaca 100  $\mu$ L de agua de mar con 10-15 nauplios. Se agregaron 100  $\mu$ L de agua de mar, para un volumen total de 200  $\mu$ L y se realizó por triplicado.
- Muestras: se agregaron en un pozo de la microplaca 100  $\mu$ L de agua de mar con 10-15 nauplios. Se agregaron 100  $\mu$ L de solución del extracto a ensayar, para un volumen total de 200  $\mu$ L y se realizó por triplicado.
- Incubación: se incubó la placa a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas. Después de las 24 horas, se observó si el control negativo presentaba nauplios muertos; en este caso, la prueba no es válida y se debe repetir. El control negativo no presentaba nauplios muertos, por lo cual la prueba fue tomada como válida y se procedió a contar con el estereoscopio el número de nauplios muertos y número total de nauplios en cada pozo.

e) Interpretación

- Se calculó el porcentaje de camarones muertos de la siguiente manera:  
Se sumó el número de camarones muertos en los tres 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
- La prueba se repitió cuando el porcentaje de camarones muertos fue mayor al 50%. Las dosis usadas fueron de 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL.
- Se obtuvieron los valores de X y Y de cada dosis y se determinó el valor de  $CL_{50}$  con el programa de computadora Finney (DOS)
- La citotoxicidad fue mayor de 1 mg/mL cuando el porcentaje de camarones muertos fue menor al 50%.

**4. Determinación de citotoxicidad y genotoxicidad con *A. cepa* por el método de Fiskesjö (1985)**

a) Preparación del bioensayo

- Se colectaron cebollas blancas de 2 cm de diámetro y se secaron por dos semanas a temperatura ambiente, intercalando con exposiciones cortas al sol (todos los bulbos con crecimiento de tallo fueron retirados)

b) Preparación de extractos

- Se pesó 1 gramo de extracto y se disolvió en 1 L de agua del chorro, para llegar a una concentración de 1 mg/mL.

c) Limpieza de los bulbos de cebolla

- Previo al montaje de la prueba, se limpiaron los bulbos eliminando la epidermis seca y removiendo, con un bisturí, los restos de tejido y raíces del área radicular, 10 bulbos de cebolla por cada concentración evaluada. Es importante no dañar las raíces primordiales. Con el fin de eliminar los restos de tejido, los bulbos fueron colocados en agua destilada por 2 h y se dejaron secar.

- 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. El volumen de agua perdido fue repuesto por lo menos dos veces al día.
- Se observó el crecimiento de las raíces y se descartaron todas aquellas cebollas que presentaron raíces con crecimiento menor de 2 cm, así como los bulbos que presentaron signos de putrefacción o crecimiento de tallo.
- Se midieron los cinco ápices más largos y los cinco más cortos y se calculó la media de crecimiento por cada cebolla, los valores muy altos o muy bajos fueron descartados (se numeró cada cebolla como individuo y la serie de cinco tubos de cada concentración evaluada).

#### d) Evaluación del efecto citotóxico

- Se preparó una concentración del extracto a ensayar de 1 mg/mL con agua del chorro, como control negativo utilizar agua del chorro y como control positivo se utilizó Paraquat® en concentración de 0.004 mg/mL; cada una de las muestras con cinco réplicas ( $p = 0.05$ ).
- Los tubos se llenaron con cada uno de los extractos y controles; este llenado fue hecho hasta el borde del tubo. Luego se colocaron los bulbos limpios sobre la boca del tubo, cuidando que la zona radicular quedara inmersa en el líquido (si se trabaja con bulbos de diámetro pequeño, las pruebas se realizan en tubos de ensayo de 10 cm de longitud x 1.5 cm de ancho. En el caso de bulbos de mayor diámetro pueden utilizarse tubos o recipientes de mayor volumen, dependiendo del tamaño de los mismos. Es importante destacar que la profundidad de los recipientes debe ser tal que, al término de la prueba, la elongación máxima no alcance el fondo del recipiente).
- Se colocaron los tubos en una gradilla y se localizó sobre una mesa que no presentara vibraciones. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante un período de 48 h, evitando la iluminación directa.
- Dos veces al día durante el período de prueba se repuso el volumen perdido por evaporación o absorción. Para reponer este volumen se utilizó la muestra o

dilución correspondiente, inclinando el bulbo sin sacar las raíces del tubo, adicionando cuidadosamente el volumen con ayuda de una pipeta Pasteur.

e) Evaluación del efecto genotóxico

- Una vez finalizada las 72 h de exposición de las raíces en cada solución, se cortaron con la ayuda de un bisturí, los ápices en las porciones distales, con 1 mm de grosor y se colocaron en un vidrio de reloj con 1 a 2 mL de orceína acética, la cual fue calentada hasta que emitió vapores evitando ebullición y desecación. El proceso se repitió hasta cumplir 4 min.
- Se realizaron cinco preparados de cada concentración. En un portaobjetos se colocaron 1 o 2 porciones de ápices teñidos (con un mínimo aproximado de 1000 células) con una gota de gelatina, cubriendo con un cubreobjetos. Con ayuda de un lápiz se extendieron las raíces procurando dejar una capa fina de células extendidas.
- Se observó al microscopio con objetivo 100X contando 1000 células por muestra y se anotó el número de células observadas en los diferentes estadios celulares (profase, metafase, anafase y telofase) y el número de células con alteraciones y aberraciones cromosómicas.

f) Interpretación

- El efecto citotóxico se determinó en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas al extracto ensayado contra las de cebollas no expuestas, luego de un período de 48 h de prueba. La cuantificación del efecto se realizó estableciendo la longitud del crecimiento de los ápices y se calculó el promedio de crecimiento del total de ápices de cada cebolla.
- El efecto genotóxico se determinó calculando el índice mitótico en cada tratamiento, haciendo uso de la ecuación:  $\text{número de células en ciclo celular} / \text{total de células observadas} * 100$ . Así mismo, se realizó una descripción de las aberraciones nucleares y cromosómicas encontradas en las cebollas después del contacto con los tratamientos.

Cálculo del índice Mitótico:

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

$$\% \text{ de inhibición} = (\text{IM control neg.} - \text{IM concentración}) * 100 / \text{IM control neg.}$$

## 5. Linfoproliferación *in vitro*

### a) Aislamiento y preparación de linfocitos

- En la campana de flujo laminar se agregaron 5 mL de sangre periférica con anticoagulante EDTA sobre 5 mL de Histopaque utilizando una pipeta automática.
- Se centrifugó durante 5 min en frío (2-8°C) a 2400 rpm y a temperatura ambiente por 15 min a la misma revolución.
- Cuidadosamente se aspiró la capa de linfocitos formada y todas las capas de linfocitos fueron transferidos a un tubo cónico. Se agregaron 10 mL de PBS.
- Se mezcló cuidadosamente y se centrifugó a 1400 rpm durante 5 min para realizar su lavado.
- Se decantó el sobrenadante y se repitió el procedimiento tres veces más.
- Se resuspendieron las células en 2 mL de RPMI.

### b) Conteo celular

- Se tomaron 10 µL de la suspensión celular y fueron colocados en la cámara de Neubauer para su recuento.
- Se contaron los cuatro cuadrantes de la cámara y se ajustó la concentración de linfocitos con RPMI hasta contar 375 células en cada cuadrante para llegar a una concentración final de  $1.5 \times 10^7$  células/mL.
- Se realizó el recambio de RPMI por el mismo volumen de RPMI-FBS y se centrifugó en frío (2-8°C) a 1400 rpm.

c) Reto linfoproliferativo

- Se incubó toda la placa en una jarra con candela durante cuatro días a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.
- Se agregaron 25 µL de la solución de XTT a cada uno de los pozos y se incubó nuevamente a 37°C durante 4 h cubriendo la placa con papel aluminio para evitar el contacto con la luz ya que este reactivo es fotosensible.
- Se agregaron 25 µL de SDS como solución de parada de la reacción.
- Se realizó la lectura usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm y se comparó la viabilidad de las células con el aumento de absorbancia (Guerrero Gutiérrez, 2009a).

**6. Determinación de la actividad antioxidante por el método micrométrico del DPPH (Blois, 1958)**

a) Preparación de solución madre

- Se pesaron 20 mg de extracto seco y se agregó 1 mL de metanol absoluto
- Se sonicó por 30 min para obtener la solución madre
- Se preparó la siguiente serie de diluciones:

No.	Muestra (µL)	Metanol (µL)	Dilución	Concentración (mg/mL)
1	50	200	0.2	4
2	100	150	0.4	8
3	150	100	0.6	12
4	200	50	0.8	16
5	250	0	1.0	20

b) Solución de DPPH 150 µM en metanol

- Se pesó 1.7 mg de reactivo de DPPH y se disolvió con metanol hasta un volumen de 25 mL en un balón aforado
- Se agitó la solución y se conservó en un recipiente ámbar
- Por ser una solución inestable, se preparó la solución el mismo día que fue empleada

c) Preparación de los pozos de reacción

- Se utilizaron microplacas de 96 pozos de fondo plano. Los pozos utilizados fueron nuevos
- Se preparó una serie de pozos con los reactivos que se citan a continuación (todas las mediciones de volumen se realizaron con pipetas automáticas):

Reactivo Pozo	Muestra	Metanol	Solución de DPPH (150 $\mu$ M)
Blanco control	0 $\mu$ L	220 $\mu$ L	0 $\mu$ L
Control	0 $\mu$ L	20 $\mu$ L	200 $\mu$ L
Blanco de ensayo	20 $\mu$ L	200 $\mu$ L	0 $\mu$ L
Ensayo	20 $\mu$ L	0 $\mu$ L	200 $\mu$ L

d) Distribución en la placa

Se distribuyeron las muestras para que se pudieran leer cuatro de ellas en una placa de la siguiente manera:

- Se colocaron en las filas las repeticiones (A-C, F-H) y blanco de cada muestra (Fila D y E)
- Se colocaron en las columnas cada una de las diluciones de ensayo (1-5, 8-12)
- Se colocó el blanco del control en los pozos 6A y 6H y el control en los pozos 7A y 7H
- Se prepararon los pozos de la manera indicada anteriormente y se agitó la microplaca en un vortex para placas durante 30 segundos
- Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos en un ambiente protegido de la luz
- Se leyó la placa en un lector de microplacas a una longitud de onda de 490 nm.

e) Porcentaje de inhibición

- Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de inhibición de cada uno de los pozos de reacción:

$$\frac{\text{Absorbancia del control}^1 - \text{Absorbancia del ensayo}^{2*}}{\text{Absorbancia del control}^1} 100 = \% \text{ Inhibición}$$

<sup>1</sup>: Absorbancia del control – Absorbancia del blanco de control

<sup>2</sup>: Absorbancia del ensayo – Absorbancia del blanco de ensayo

- Se elaboró una gráfica lineal con los valores de porcentaje de inhibición y concentración de cada dilución
- Los valores de porcentaje de inhibición se deben encontrar entre el 60-70% y la ecuación de la recta debe tener un  $r^2$  entre 0.97-0.99 para que la corrida sea aceptada (Gudiel, 2009)
- Se determinó la concentración inhibitoria media según la siguiente fórmula:

$$IC_{50} = \frac{50\% - \text{Pendiente}}{\text{Intercepto}}$$

## 7. Fenoles totales (Singleton et al., 1999)

### a) Preparación de soluciones

- Carbonato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 10% p/v: en balanza analítica se pesaron 10 g de carbonato de sodio anhidro y se disolvieron en 100 mL de agua desmineralizada. La solución se agitó y conservó en recipiente color ámbar.
- Ácido gálico anhidro ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ) 1 mg/mL: se pesaron 8 mg de ácido gálico anhidro y fueron disueltos en 8 mL de agua desmineralizada. Se diluyó 1:10 (1 mL de solución de ácido gálico 1 mg/mL en 9 mL de agua) y conservó en frasco de color ámbar.

b) Tubos de reacción y curva de lectura

- Se utilizaron tubos de vidrio de 10 mL y se preparó una serie de tubos que contenían los siguientes reactivos:

	H <sub>2</sub> O (mL)	Ácido gálico (µL) solución 1 µg/10 µL	Reactivo de Folin- Ciocalteu (mL)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10% (mL)
Blanco	4.000	0	0.4	0.8
Patrón 1	3.975	25	0.4	0.8
Patrón 2	3.950	50	0.4	0.8
Patrón 3	3.900	100	0.4	0.8
Patrón 4	3.850	150	0.4	0.8
Patrón 5	3.800	200	0.4	0.8
Patrón 6	3.750	250	0.4	0.8
Muestra 1a	3.950	50	0.4	0.8
Muestra 1b	3.900	100	0.4	0.8

- Se agregó 0.4 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 0.8 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% a todos los tubos
- Se agitaron los tubos en vortex durante 30 seg
- Se incubó en baño maría a temperatura de 90-100°C durante 1 min
- Se dejó enfriar y se leyó la absorbancia a 765 nm
- Se realizó el ensayo por triplicado.

c) Registro de resultados de la curva y cálculo de la concentración de fenoles expresado en µg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso

- Se midió la absorbancia 1, 2 y 3 de cada tubo y luego se realizó un promedio.
- Se colocó en la tabla la concentración en µg (equivalentes de ácido gálico).
- Se realizó la regresión lineal de los datos de la curva de calibración graficando en el eje de las abscisas (y) el promedio de las absorbancias y en el eje de las ordenadas (x) la concentración en µg equivalentes de ácido gálico.
- Se calculó la concentración de la muestra utilizando la ecuación de la línea recta despejando "x".

- El resultado así obtenido se utilizó para calcular los  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico / mg peso seco. El cálculo se realizó de la siguiente forma:

$$\frac{\mu\text{geq.de ácido gálico}}{\text{mg peso seco}} = \frac{\text{resultado de la ecuación de la recta } (\mu\text{g})}{\text{volumen medido (mL)} * \frac{\text{g peso seco}}{\text{mL extracto}} * \frac{1,000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}}$$

## VIII. RESULTADOS

El rendimiento de cada uno de los extractos realizados, indicado como gramos obtenidos de extracto seco y como porcentaje de rendimiento, se muestra en el Cuadro 1. Se obtuvo un mejor rendimiento de los extractos al usar metanol como disolvente.

Cuadro 1. Rendimiento de los extractos de *C. grandifolia* y *C.pyramidata*

Especie	Parte	Diclorometano		Metanol		
		g	%	g	%	
<i>C. grandifolia</i>	Cultivada	Hoja	8.70	4.35	17.50	8.75
	Silvestre	Hoja	9.20	4.60	19.20	9.60
<i>C. pyramidata</i>	Cultivada	Hoja	1.80	0.90	5.90	2.95
	Silvestre	Hoja	9.60	4.80	18.50	9.25

#: Porcentaje de rendimiento

Fuente: Datos experimentales

La actividad antioxidante se determinó por el método de DPPH. Según se observa en el Cuadro 2, la mayor actividad se obtuvo en las fracciones metanólicas y en la especie *C. grandifolia* silvestre, seguida de *C. pyramidata* cultivada, las cuales necesitaron menos concentración de estos extractos para reducir el 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo al 50%.

Cuadro 2. Determinación de actividad antioxidante por método micrométrico DPPH

Especie		Fracción	CI <sub>50</sub> (mg/mL)
<i>C. grandifolia</i>	Cultivada	Diclorometano	14.22±0.09
		Metanol	2.78±0.07
	Silvestre	Diclorometano	8.70±0.01
		Metanol	2.03±0.19
<i>C. pyramidata</i>	Cultivada	Diclorometano	6.40±0.51
		Metanol	2.16±0.12
	Silvestre	Diclorometano	10.28±0.61
		Metanol	3.78±0.05

IC<sub>50</sub>: concentración inhibitoria media

Fuente: Datos experimentales

La determinación de fenoles totales se realizó por el ensayo de Singleton, encontrándose una mayor concentración en las fracciones metanólicas (Cuadro 3). La concentración de fenoles es equivalente a la concentración de ácido gálico. En este ensayo también se observa una mayor cantidad de fenoles en las fracciones metanólicas y en la especie *C. grandifolia* silvestre.

Cuadro 3. Determinación de fenoles totales por el método de Singleton.

<b>Especie</b>	<b>Fracción</b>	<b>µg ácido gálico/ mg extracto</b>	
<i>C. grandifolia</i>	Cultivada	Diclorometano	30.40
		Metanol	113.60
	Silvestre	Diclorometano	38.40
		Metanol	133.60
<i>C. pyramidata</i>	Cultivada	Diclorometano	27.35
		Metanol	50.25
	Silvestre	Diclorometano	20.00
		Metanol	36.80

Fuente: Datos experimentales

La citotoxicidad general fue evaluada mediante la prueba de letalidad de la *A. salina*, determinándose la concentración que causa la mortalidad del 50% de los nauplios (CL<sub>50</sub>). El 50% de los extractos presentó una CL<sub>50</sub> mayor de 1 mg/mL, por lo que se pueden considerar como no tóxicos.

Cuadro 4. Toxicidad de los extractos por la prueba de *A. salina*

<b>Especie</b>	<b>Fracción</b>	<b>CL<sub>50</sub> (mg/mL)</b>	
<i>C. grandifolia</i>	Cultivada	Diclorometano	>1.00
		Metanol	>1.00
	Silvestre	Diclorometano	0.68
		Metanol	0.58
<i>C. pyramidata</i>	Cultivada	Diclorometano	0.50
		Metanol	>1.00
	Silvestre	Diclorometano	0.66
		Metanol	>1.00

Fuente: Datos experimentales

La elongación de las raíces de cebolla fue inhibida en más del 50% en todos los extractos analizados, demostrando una elevada actividad citotóxica. Dichos extractos también presentaron una elevada actividad genotóxica, al observarse pocas células en mitosis (en los extractos de metanol) o nulas (en los extractos de diclorometano).

Cuadro 5. Actividad citotóxica y genotóxica de extractos de *C. grandifolia* y *C. pyramidata* sobre el crecimiento radicular de *A. cepa*

Especie	Fracción	Media del crecimiento radicular $\pm$ DE <sup>a</sup>	Índice mitótico	Porcentaje de inhibición (%)	
Agua de chorro <sup>b</sup>	NA	3.47 $\pm$ 1.39	24.30	NA <sup>d</sup>	
Paraquat 0.04 mg/mL <sup>c</sup>	NA	1.75 $\pm$ 1.61	0.00	NA	
<i>C. grandifolia</i>	Cultivada	Diclorometano	1.00 $\pm$ 0.97	0.02	99.92
		Metanol	0.44 $\pm$ 0.32	7.80	67.90
	Silvestre	Diclorometano	0.28 $\pm$ 0.63	0.00	100.00
		Metanol	0.39 $\pm$ 0.29	4.20	82.72
<i>C. pyramidata</i>	Cultivada	Diclorometano	1.64 $\pm$ 0.99	0.00	100.00
		Metanol	0.22 $\pm$ 0.21	2.70	88.89
	Silvestre	Diclorometano	0.00 $\pm$ 0.00	0.00	100.00
		Metanol	0.40 $\pm$ 0.26	3.10	87.24

a: DE: Desviación estándar; b: Control negativo; c: Control positivo; d: No aplica

Fuente: Datos experimentales

El 87.5% de los ensayos de linfoproliferación *in vitro* evidenciaron actividad inmunomoduladora, ya sea estimulando (25%) o inhibiendo (62.5%) la proliferación linfocitaria. El 12.5% de los ensayos vieron inalterada la linfoproliferación.

Cuadro 6. Actividad inmunomoduladora de extractos de *C. grandifolia* y *C. pyramidata* sobre la proliferación de linfocitos

Especie	Fracción	Concanavalina A		Fitohemaglutinina		
		% Inhibición/ Estimulación <sup>a</sup>	Actividad	% Inhibición/ Estimulación <sup>a</sup>	Actividad	
<i>C. grandifolia</i>	Cultivada	Diclorometano	-128.73	I++	-297.38	I+++
		Metanol	-39.17	I+	-145.75	I++
	Silvestre	Diclorometano	1080.42	E+++	276.50	E+++
		Metanol	-1216.00	I+++	-137.97	I++
<i>C. pyramidata</i>	Cultivada	Diclorometano	-643.64	I+++	-1384.53	I+++
		Metanol	-149.06	I++	-168.90	I++
	Silvestre	Diclorometano	1895.83	E+++	16.15	IN
		Metanol	194.71	E++	4.64	IN

a: Porcentaje de estimulación de 0-25%: Inalterado  
 Porcentaje de estimulación de 25-30%: E±  
 Porcentaje de estimulación de 31-100%: E+  
 Porcentaje de estimulación de 101-200%: E++  
 Porcentaje de estimulación >201%: E+++

a: Porcentaje de inhibición de 25-30%: I±  
 Porcentaje de inhibición de 31-100%: I+  
 Porcentaje de inhibición de 101-200%: I++  
 Porcentaje de inhibición >201%: I+++

Fuente: Datos experimentales

## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio fue evaluada la actividad antioxidante y citotóxica de extractos de diclorometano y metanol de *C. grandifolia* y *C. pyramidata*, usando plantas cultivadas y plantas silvestres. Estas plantas son usadas popularmente en el tratamiento de gastritis, fiebre, asma y dolores corporales, y en menor medida, se le atribuyen propiedades anticancerígenas, a pesar de poseer información muy escasa sobre su actividad citotóxica.

Los disolventes elegidos para la realización de los extractos fueron el diclorometano y el metanol. Estos dos disolventes, clasificados como disolventes generales, poseen un gran poder extractivo ya que en su estructura tienen una región con cierta polaridad (afín a los compuestos polares) y una región no polar (semejante a compuestos no polares). Debido a esta característica, pueden disolver gran cantidad de sustancias de polaridad intermedia, siendo este el caso de constituyentes activos de plantas que no son bien conocidos. El rendimiento de los extractos fue mayor cuando se usó metanol como disolvente (Cuadro 1), estableciéndose así que los compuestos extraídos del material vegetal poseen una naturaleza polar. La gran mayoría de sustancias naturales de interés como los alcaloides, flavonoides, glicósidos cardiotónicos y terpenos son extraídas con metanol (Sharapin, 2000).

La actividad antioxidante se determinó por el método de DPPH según Blois y fenoles totales por el ensayo de Folin-Ciocalteu, los dos ensayos se basan en reacciones redox. En el método de DPPH en el cual se determinó la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ), se observó que las fracciones metanólicas presentaron una mejor actividad que las fracciones con diclorometano. La especie *C. grandifolia*, la cual fue colectada en un ambiente silvestre, fue la que mostró la mejor actividad 2.03 mg/mL, seguido de la especie *C. pyramidata* cultivada 2.16 mg/mL (Cuadro 2). En este ensayo no se determina ningún metabolito en específico.

En el ensayo para determinar fenoles totales por medio de equivalentes de ácido gálico, también se observó mayor actividad en las fracciones metanólicas, siendo la especie *C. grandifolia* silvestre la que presentó la mayor concentración 133.60 µg/mg de extracto, seguida de la especie *C. grandifolia* cultivada con 113.60 µg/mg de extracto (Cuadro 3).

La actividad antioxidante se observa en mayor medida en la fracción metanólica de todas las especies, esto se puede deber a que los compuestos oxidantes presentes en las plantas puedan tener una afinidad mayor al metanol debido a la formación de puentes de hidrógeno, por lo tanto, tienen un carácter polar.

Los dos ensayos que se realizaron para determinar la actividad antioxidante determinan metabolitos secundarios presentes en las plantas, los cuales son producto del metabolismo normal. Estos también se producen cuando las plantas estén bajo distintos estímulos como estrés, ambientales, etc. Algunos metabolitos como fenoles, terpenos, flavonas y alcaloides son producidos por las plantas porque poseen propiedades alelopáticas como autodefensa que se manifiestan ante un estímulo adverso. Debido a esta propiedad las plantas pueden generar mecanismos de autodefensa ante el ataque de insectos, plagas, o incluso de otras plantas. Esta puede ser una de las razones por las cuales la especie *C. grandifolia* silvestre presente mayor actividad que las especies cultivadas, ya que en dicho ambiente tendrán que adaptarse para poder sobrevivir (Benavides, Ramírez, Robledo & Fuentes, 2009).

Se sabe que el daño oxidativo desempeña un rol inmenso en muchas enfermedades modernas como la degeneración muscular y de los tejidos, las enfermedades cardíacas, diabetes, cáncer, al igual que otras enfermedades degenerativas. Puesto que se atribuyen al estrés celular procesos inflamatorios y disfunción endotelial, considerado este último como el factor de riesgo principal de enfermedades cardiovasculares. Por todo lo anterior, resulta de gran importancia el beneficio de los antioxidantes en nuestro organismo, ya que estos pueden

detener ciertas reacciones de oxidación al neutralizar los radicales libres. La aplicación de terapias antioxidantes y otros principios activos están siendo utilizadas en la prevención y atenuación de los efectos negativos del estrés oxidante (Maldonado, Jiménez, Guapillo, Ceballos & Méndez, 2010).

La actividad citotóxica fue evaluada mediante el método de la *A. salina*, la prueba de *A. cepa* y el ensayo de linfoproliferación *in vitro*. El 50% de los extractos presentaron actividad citotóxica positiva contra *A. salina*, obteniéndose valores de  $CL_{50}$  entre 0.50 y 0.68 mg/mL (Cuadro 4). El extracto de diclorometano de *C. pyramidata* cultivada fue clasificado como moderadamente tóxico; mientras que el extracto de diclorometano de *C. pyramidata* silvestre y los extractos de diclorometano y metanol de *C. grandifolia* silvestre fueron clasificados como ligeramente tóxicos, según la clasificación de toxicidad establecida por el CYTED (Anexo 5). La actividad citotóxica positiva de estos extractos evidencia toxicidad a nivel celular en general, que al ser aislados presentarían una buena correlación con la toxicidad *in vitro* (Martínez Hormaza et al., 2006; Pino Pérez & Lazo, 2010).

Los extractos metanólicos de *C. pyramidata*, tanto cultivada como silvestre, y los extractos de diclorometano y metanol de *C. grandifolia* cultivada fueron clasificados como prácticamente no tóxicos según la clasificación del CYTED (Anexo 5). Es importante notar que el 75% de los extractos de las plantas cultivadas no mostraron actividad citotóxica significativa. Esto se debe a que las plantas cultivadas suelen ser más frágiles debido a que crecen sobreprotegidas, mientras que las plantas silvestres se vuelven más robustas ya que perduran las más resistentes, es decir, hay un mecanismo de selección natural (Osorio Durango, 2009).

Para la prueba de *A. cepa*, el 100% de los extractos mostró un porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces mayor al 65% (Cuadro 5). La dinámica de la elongación de las raíces de la cebolla es muy sensible a la presencia de sustancias tóxicas presentes en el líquido de rehidratación. El alto porcentaje de

inhibición evidencia los efectos mutagénicos en los meristemos radiculares, que puede deberse al retardo en el proceso de mitosis o en la destrucción celular. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz y, por tanto, su elongación (Castillo Morales, 2004)

El índice mitótico en los cuatro extractos de diclorometano fue de 0.00 y en los cuatro extractos metanólicos fue menor a 10, siendo este índice una medida de la rápida respuesta de las células en división a las sustancias genotóxicas. Una posible explicación es que los extractos metanólicos detienen los procesos celulares sin importar la fase en la que se encuentren, lo cual permite observar células en todas las fases del ciclo. Mientras tanto, los extractos de diclorometano permiten que continúe el ciclo celular, aparentemente, hasta la interfase, y así se produce un estancamiento en ella, lo cual es evidente en el hecho que la mayoría de las células visibles estaban en interfase. La interfase no se toma en cuenta para el cálculo del índice mitótico (Freyre et al., 2009).

En el caso del ensayo de linfoproliferación *in vitro*, el 37.5% de los extractos mostraron actividad estimuladora y el 62.5% mostraron actividad inhibitoria cuando se usó la concanavalina A (Cuadro 6). Al usar la fitohemaglutinina, se pudo observar que el 62.5% de los extractos mostraron actividad inhibitoria, el 25% no mostró un efecto significativo, y el 12.5% mostró actividad estimuladora. En total, 10 ensayos (62.5%) de los 16 mostraron un porcentaje de inhibición mayor al 31%. Esto indica que los componentes presentes en los extractos ejercieron un papel inmunosupresor que produce una disminución en los efectos mitógenos de ambas lectinas (Blanco, Cañete & Pablos, 2007).

En el caso de *C. pyramidata* silvestre, se pudo observar que los extractos no tuvieron efectos inmunosupresores en ninguna de las dos lectinas, tanto en el extracto de diclorometano como en el de metanol. En el caso de la fitohemaglutinina, el porcentaje de estimulación fue menor al 25%, por lo que se estableció como inalterado. Al usar la concanavalina A, se pudo observar que el

porcentaje de estimulación fue mayor del 100%, por lo que los compuestos presentes en el extracto no tuvieron efecto sobre la intensa activación de los linfocitos T causada por dicha lectina (Blanco et al., 2007). Es posible también que uno o varios componentes presentes en los extractos actúen como moléculas co-estimulantes, potenciando el efecto mitogénico de las lectinas (Chaves, Chacón, Badilla & Arévalo, 2007)

Los extractos de las plantas cultivadas mostraron una mayor acción inmunosupresora cuando se usó la fitohemaglutinina como mitógeno. El porcentaje de inhibición fue entre 1.13 a 3.72 veces mayor, en comparación con la inhibición mostrada al usar concanavalina A. De igual manera, los extractos de las plantas silvestres evidenciaron una actividad inmunomoduladora entre 3.91 a 8.81 veces mayor al usar concanavalina A como mitógeno (Borras, 1994). La actividad inmunomoduladora de los extractos de plantas medicinales está relacionada con la presencia de distintos metabolitos secundarios. En muchos casos, los alcaloides, saponinas y los triterpenos son responsables de la actividad biológica de una planta. Al estar en un ambiente de competencia, las plantas silvestres se ven en la necesidad de expresar este tipo de metabolitos en mayor proporción para poder adaptarse al ambiente. En Guatemala, se realizó el tamizaje fitoquímico de la variedad silvestre de *C. pyramidata*, la cual fue recolectada en Suchitepéquez. En este caso, se demostró la presencia de alcaloides, cumarinas, antocianinas, saponinas, flavonoides y principios amargos. Al no poseer información de tamizajes fitoquímicos realizados a la otra especie en estudio, así como a sus variedades cultivadas y silvestres, es difícil determinar que metabolito secundario es responsable de la acción inmunomoduladora (Castro Díaz, 2006).

Un estudio realizado con anterioridad en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (Guerrero Gutiérrez, 2009a) determinó la actividad inmunomoduladora de extractos etanólicos de *C. grandifolia* y *C. pyramidata*; donde únicamente se encontró inhibición linfocitaria del 31 al 100% en el extracto de *C. grandifolia*. Estos resultados contrastan con los obtenidos en este estudio, ya que el 75% de

los ensayos de *C. grandifolia*, ya sea cultivada o silvestre, mostraron inhibición en la proliferación linfocitaria. Es importante notar que los ensayos con diclorometano tuvieron un mejor desempeño que los de metanol, por lo que se podría interpretar que los compuestos inmunomoduladores tienen una naturaleza de baja polaridad. Las plantas para este estudio no fueron clasificadas como silvestres o cultivadas, por lo que este criterio no pudo ser comparado. En otro estudio (Guerrero Gutiérrez, 2009b) se evaluó la actividad citotóxica con extracto etanólico de *C. grandifolia*, donde se observó que a concentraciones de 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL no hubo muerte de los nauplios de *A. salina*, por lo que la actividad citotóxica se consideró como negativa. *Artemia franciscana* es la especie de *Artemia* que comúnmente se comercializa para fines alimenticios en acuicultura y acuariofilia. Algunas personas denominan *A. salina* a cualquier especie del género *Artemia*, siendo comercialmente la más abundante la *A. franciscana* (Sánchez & Neira, 2005). Es posible que los resultados de ese estudio hayan diferido de los resultados aquí presentados debido a un etiquetado incorrecto de la *Artemia*. Debido a esto, la *Artemia* usada por Guerrero Gutiérrez pudo haber resistido mejor a los factores abióticos, por lo que no se observó muerte en los nauplios.

## X. CONCLUSIONES

- Los extractos metanólicos de *Cornutia* spp. estudiados, presentaron mayor rendimiento que los extractos diclorometánicos.
- La especie silvestre de *C. grandifolia* presentó mayor actividad antioxidante (2.03 mg/mL en DPPH y 133.60 µg/mg de extracto en fenoles totales, ambos en fracción metanólica) que las otras especies estudiadas.
- Solamente los extractos de especímenes silvestres mostraron citotoxicidad en la prueba de *A. salina*.
- Todos los extractos evidenciaron citotoxicidad mayor a 65% en el ensayo de crecimiento de las raíces de *A. cepa*.
- La genotoxicidad de los extractos fue elevada en todos los casos, obteniéndose un índice mitótico menor de 10.
- Se observó inhibición de la proliferación linfocitaria en 62.5% de los extractos estudiados.
- Los extractos de las plantas silvestres mostraron una respuesta entre 3.91 a 8.81 veces mayor a la linfoproliferación al usar concanavalina A como mitógeno.
- Se obtuvo mayor actividad de proliferación linfocitaria en los extractos de plantas silvestres que en los extractos de plantas cultivadas.
- Los extractos de los especímenes silvestres poseen efectos antioxidantes y citotóxicos.

## **XI. RECOMENDACIONES**

- Hacer una comparación del contenido de metabolitos de los extractos estudiados, mediante tamizaje fitoquímico, con el objeto de explicar la diferencia en la actividad mostrada entre las especies silvestres y las cultivadas.
- Realizar las pruebas de citotoxicidad usando diferentes concentraciones de los extractos y determinar la relación dosis-efecto.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam, M., Bristi, N. & Rafiquzzaman, M. (2012). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143-152.
- Ascarrunz, J., Olivares, D., Taboada, M. & Romero, A. (1999). Evaluación del potencial genotóxico de 4 extractos vegetales de la medicina tradicional boliviana. *Biofarbo*, 8, 57-66.
- Avello, M. & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 494(2), 161-172
- Bautista Garfias, C.R., Acosta García, E. & Toledo García, I.I. (2000). Evaluación del bioensayo de MTT para determinar la proliferación *in vitro* de linfocitos de bovino frescos y congelados. *Veterinaria México*, 31(2), 101-106.
- Benavides, A., Ramírez, H., Robledo, V. & Fuentes, L. (2009). Antioxidantes en las plantas: algunos factores edáficos y ambientales que los modifican. *Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo*, 13-26
- Blanco, F.J., Cañete, J.D., & Pablos, J.L. (2007). *Monografías SER: Técnicas de investigación básica en reumatología*. Madrid: Médica Panamericana.
- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- Borras, X. (1994). Efectos del estrés psicológico en la respuesta linfocitaria a los mitógenos. *Anuario de Psicología*, 61, 33-39.
- Castillo Morales, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. México: IMTA.
- Castro Díaz, S.L. (2006). Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Isertia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. (Tesis de Licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Cates, R.G., Prestwich, B., Innes, A., Rowe, M., Stanley, M., Williams, S., ... & Martinez, J. V. (2013). Evaluation of the activity of Guatemalan medicinal

- plants against cancer cell lines and microbes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(35), 2616-2627.
- Chaves, F., Chacón, M., Badilla, B., & Arévalo, C. (2007). Effect of *Echinacea purpurea* (Asteraceae) aqueous extract on antibody response to *Bothrops asper* venom and immune cell response. *International Journal of Tropical Biology and Conservation*, 55(1), 113-119.
- Cicco, N., Lanorte, M., Paraggio, M., Viggiano, M. & Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 91, 107–110.
- Deng, J., Cheng, W. & Yang, G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125, 1430–1435.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna D., Stocker, P. & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654–660.
- Finkel, T. & Holbrook, N. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.
- Fiskesjö, G. (1985). The *Allium* test as a standar in environmental monitoring. *Hereditas*, 102, 99-112.
- Freyre, S., Estrada, M. & Bolaños, H. (2009). Estudio preliminar de la citotoxicidad y la genotoxicida de un extracto de origen vegetal conocido como palmo rosado en células merisméticas de *Allium cepa*. *Revista Nacional de Investigaciones*, 5(12), 12-17.
- Gaitán, I.C. (2005). Actividad de doce plantas nativas guatemaltecas contra *Sporothrix schenkii*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Garrido, D. & Parada, R. (2008). Propiedades antioxidantes y funcionales de cinco algas chilenas sobre la calidad de pasta de salmón. (Tesis de Ingeniería). Universidad de Chile, Santiago.
- Genaro, A. (2003). *Remington Farmacia*. Vol. II. (13<sup>a</sup> ed.). Madrid: Panamericana.

- Gudiel, L. (2009). Evaluación fitoquímica y actividad antioxidante de *Polypodium triseriale* SW (calahuala). (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Guerrero Gutiérrez, K.M. (2009a). Actividad inmunomoduladora de hojas de *Cornutia pyramidata* L. y *Cornutia grandifolia* Shauer in DC. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Guerrero Gutiérrez, K.M. (2009b). Actividad biocida de hojas de *Cornutia grandifolia* Shauer in DC. (Tesis de Maestría). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 1841–1856.
- Krishnaraju, A.V, Rao, T., Sundararaju, D., Vanisree, M., Tsay, H. & Subbaraju, G. V. (2006). Biological screening of medicinal plants collected from Eastern Ghats of India using *Artemia salina* (brine shrimp test). *International Journal of Applied Science and Engineering*, 4(2), 115-125.
- Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J. & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726-732.
- Lindsay, D. (1999). Diet and ageing: the possible relation to reactive oxygen species. *Journal of Nutrition Health Aging*, 3(2), 84-91.
- Magalhães, L., Santos, F., Segundo, M., Reis, S. & Lima, J. (2010). Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, 83, 441–447.
- Maldonado, O., Jiménez, E., Guapillo, M., Ceballos, G. & Méndez, E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Mexicana de la Universidad Veracruzana*, 32-39.
- Martínez Hormaza, I., Quintero Rodríguez, G., Márquez Montiel, L., González Lavaut, J., Álvarez Reyes, A. & Zarragoitía, A. (2006). Determinación de la citotoxicidad de extractos de *Erythroxylum confusum* Britt. mediante el método de la *Artemia salina*. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 25(3), 429-31.

- Marwah, R., Fatope, M., Mahrooqi, R., Varma, G., Abadi, H. & Al-Burtamani, S. (2007). Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food Chemistry*, 101(2), 465-470.
- Medinilla, B. (1996). *Manual de Laboratorio de Farmacognosia*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 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(5), 31-34.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. (2002). *Real Farmacopea Española*. (2ª ed.). Madrid.
- Molina, R.Y. (2005). Determinación de la actividad biocida del extracto etanólico y sus particiones (hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa) de hojas de *Cornutia pyramidata* L (jorobté). (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Mukherjee, A.K., Basu, S., Sarkar, N., & Ghosh, A.C. (2001). Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Current Medicinal Chemistry*, 8(12), 1467-1486.
- Muñoz Solarte, D.M. & Guerrero Pepinosa, N. (2013). *Allium test* para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de extractos naturales en células meristemáticas de *Allium cepa*. *Memorias*, 11(19), 83-86.
- Nash, D.L. & Nee, M. (1984). *Flora de Veracruz*. (Fascículo 41: *Verbenaceae*). México: Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos.
- Ojha, H., Mishra, K. & Chaudhury, N. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130, 1036–1043.
- Osorio Durango, E.J. (2009). *Aspectos Básicos de Farmacognosia*. Colombia: Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquía.
- Pino Pérez, O. & Lazo, F. (2010). Ensayo de *Artemia*: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 25(1), 34-43.

- Puertas, M., Rios, J. & Saez, J. (2009). Actividad antioxidante *in vitro* de extractos de tallos de *Polygala* sp. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(4).
- Rugeles López, M.T., Patiño Grajales, P.J. & Montoya Guarín, C.J. (2009). *Inmunología: Una ciencia activa*. (2ª ed.). Colombia: Universidad de Antioquia.
- Samol Juárez, V.G. & Santizo Paz, B.C. (2011). Actividad inhibitoria de extractos y aceites esenciales de especies condimentarias, alimenticias y medicinales contra *Campylobacter jejuni*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Sánchez, L. & Neira, A. (2005). Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava* L. y *Psidium guineense* Sw. *Cultura Científica*, 3, 40-45.
- Saravia Gómez, A. (2009). *Validación farmacológica y evaluación fitoquímica de extractos de plantas medicinales de uso popular en Guatemala como anticancerígenos*. Informe final. Proyecto FODECYT No. 11-2006. (Guatemala, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).
- Sharapin, N. 2000. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: Convenio Andrés Bello.
- Singleton, V., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–179.
- Standley, P.C., Williams, L.O., & Gibson, D.N. (1970). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(9), 196-198.

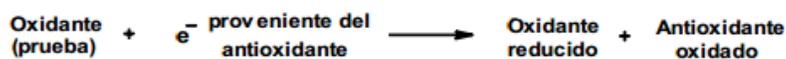
### XIII. ANEXOS

**Anexo 1.** Clasificación de algunos modelos de ensayos para la determinación de la actividad antioxidante in vitro según su modo de reacción ET o HAT (Huang et al., 2005).

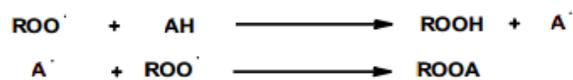
ENSAYO	CATEGORIA
Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS <sup>••</sup> )	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH <sup>•</sup> )	
Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)	
N,N- dimetil- <i>p</i> -fenilendiamina (DMPD)	
Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)	
Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)
Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP)	
Inhibición de la oxidación del ácido linoleico	
Inhibición de la oxidación de los lipido de baja densidad (LDL)	

**Anexo 2.** Mecanismo de reacción de transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrogeno (Huang et al., 2005).

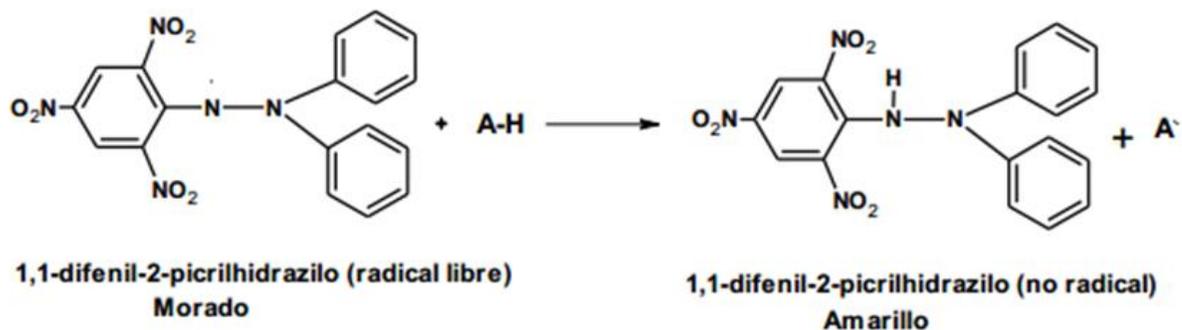
#### Ensayos ET



#### Ensayos HAT



**Anexo 3.** Estructura de DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (Alam et al., 2012).



**Anexo 4.** Reacción de transferencia de electrones con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Huang et al., 2005).



**Anexo 5.** Clasificación de toxicidad según el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) (Sánchez & Neira, 2005).

Clase	Toxicidad	Dosis estimada ( $\mu\text{g/mL}$ )
I	Extremadamente tóxico	1-10
II	Altamente tóxico	11-100
III	Moderadamente tóxico	101-500
IV	Ligeramente tóxico	501-1000
V	Prácticamente no tóxico	1001-1500
VI	Relativamente inocuo	>1500

María Linda Mendoza Prillwitz  
Autora

Vivian Stephanie Oliva Flores  
Autora

M.A. Ana Margarita Paz de Ramírez  
Asesora

Lic. Armando Cáceres  
Co-Asesor

Lic. Keila Mariana Guerrero Gutiérrez  
Revisora

M.Sc. Alba Marina Valdés de García  
Directora Escuela Química Biológica

Rubén Dariel Velásquez Miranda, Ph.D.  
Decano Facultad CC.QQ y Farmacia