



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
Escuela de Formación Profesional de  
Farmacia y Bioquímica

**Tesis**

“Citotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y fruto  
inmaduro de *Inga edulis* Mart. sobre *Artemia franciscana*”

Para optar el título de

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Autores**

**Bach. EDWARD JOAO SINTI OCHAVANO**  
**Bach. FIORELLA DELFINA TORRES ROJAS**

**Asesor:**

**Q.F MARIO JAVIER DE LA CRUZ FLORES**

**Iquitos – Perú**

**2017**



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

**ACTA DE SUSTENTACIÓN**

En el caserío de Nina Rumi, Distrito de San Juan Bautista, Departamento de Loreto, a los 16 días del mes de noviembre del dos mil dieciocho, siendo las 13:00 Horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designado según Resolución Decanal N° 059-FFB-UNAP-2018, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- |  |                   |
|--|-------------------|
| <b>Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Dra.</b>  | <b>PRESIDENTA</b> |
| <b>Q.F. LUIS DOMINGO NONATO RAMÍREZ, Dr.</b> | <b>MIEMBRO</b>    |
| <b>Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG</b>      | <b>MIEMBRO</b>    |

Se constituyeron en las instalaciones de la Facultad de Farmacia y Bioquímica sala de docentes, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada "CITOTOXICIDAD *In Vitro* DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE HOJAS Y FRUTO INMADURO DE *Inga edulis* Mart. SOBRE *Artemia franciscana*", presentado por los Bachilleres SINTI OCHAVANO EDWARD JOAO y TORRES ROJAS FIORELLA DELFINA, para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA, de acuerdo a la Ley Universitaria N° 30220 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

Luego de haber escuchado con atención la exposición de los sustentantes, y habiéndose formulado las preguntas respectivas, las cuales fueron respondidas:

*Satisfactoriamente*

Los miembros del Jurado Calificador llegaron a las siguientes conclusiones:

- 1.-La Tesis ha sido *Aprobada por Unanimidad*
- 2.-Observaciones *ningunas*


Siendo las 14:00 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándoles a los sustentantes por su *Exposición*

*Frida Enriqueta Sosa Amay*  
Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Dra.  
PRESIDENTA

*Luis Domingo Nonato Ramirez*  
Q.F. LUIS DOMINGO NONATO RAMÍREZ, Dr.  
MIEMBRO

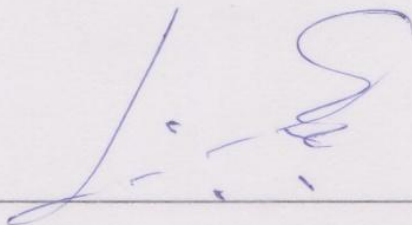
*Henry Vladimir Delgado Wong*  
Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG  
MIEMBRO

JURADO CALIFICADOR



Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY Dra.

PRESIDENTE



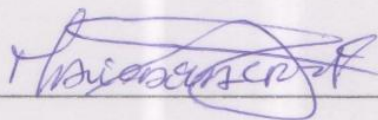
Q.F. LUIS DOMINGO NONATO RAMIREZ Dr.

MIEMBRO



Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG

MIEMBRO



Q.F. MARIO JAVIER DE LA CRUZ FLORES

ASESOR

## DEDICATORIA

En primer lugar dedico esta tesis a **DIOS TODOPODEROSO**, por haberme dado la vida y hacer posible que culmine con mucho éxito mi formación profesional.

Con mucho amor y cariño a mis padres **JOEL Y MARIA** porque ellos fueron siempre el motor y motivo para que siga adelante demostrándome el apoyo incondicional, con mucha comprensión y siendo también los guías para culminar mi carrera profesional.

A mis hermanos **MARIO JOEL Y MARIA MILAGROS**, porque ellos fueron mi fortaleza para salir adelante, y siempre estuvieron conmigo dándome consejos para ser una profesional de bien.

A todos mis familiares por estar conmigo en todo momento en especial a mis abuelitos **ABEL, FRANCISCA Y LAURA**.

A todos mis amigos en especial a **KEWIN Y ENRIQUE** que a pesar de todo estuvimos en los buenos y malos momentos, demostrando siempre nuestras destrezas y habilidades.

**FIGURELLA DELFINA TORRES ROJAS**

## DEDICATORIA

A **DIOS** por haberme permitido y dado las fuerzas necesarias para llegar a esta etapa de mi vida que es el inicio a la vida profesional de cada uno.

A mis padres **MIRIAM Y WUINDER** por el apoyo brindado durante toda mi etapa universitaria y que a pesar de las adversidades siempre estaban presentes en todo momento.

A mis amistades que fui formando en mi vida universitaria **ENRIQUE Y KEWIN** que en todo momento estuvimos apoyándonos para concretar una etapa más en nuestras vidas.

A mi tía **LOYDA (+)** que siempre estuvo en los momentos más felices de mi vida universitaria y que todos los consejos que ella me brindo me sirvieron para ser la persona que soy

A mis hermanos, parientes y primos que me brindaron el apoyo y respaldo en mi tomas de decisiones.

**EDWARD JOAO SINTI OCHAVANO**

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar agradecer a la facultad de Farmacia y Bioquímica – UNAP por habernos permitido ser parte de ella, y a todos los docentes que fueron parte de nuestra formación profesional, brindándonos conocimientos y apoyo para seguir adelante día a día.

A nuestro asesor de tesis Q.F. Mario Javier De la Cruz Flores, por habernos brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también habernos tenido la paciencia del mundo para guiarnos durante todo el desarrollo de la tesis.

Nuestro agradecimiento también va dirigido a la Dra. Dora Enith García de Sotero, por habernos facilitado con el laboratorio de BIOTECNOLOGIA – UNAP, para así poder desarrollar toda nuestra parte experimental.

Y para finalizar, agradecemos a todos los que fueron nuestros compañeros de clase durante todos los niveles de Universidad ya que gracias al compañerismo, amistad y apoyo moral han aportado nuestras ganas de seguir adelante en la carrera profesional.

**IORELLA DELFINA TORRES ROJAS**

**EDWARD JOAO SINTI OCHAVANO**

## INDICE DEL CONTENIDO

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
Portada	1
Dedicatoria	2
Agradecimiento	4
Índice	5
Índice de tablas	7
Índice de gráficos	8
Índice de figuras	9
Lista de anexos	10
Siglas y abreviaturas	11
Resumen	12
Abstract	13
<b>CAPITULO I</b>	<b>14</b>
1.1. Introducción	14
1.2. Objetivos	16
1.2.1. Objetivo General	16
1.2.2. Objetivos Específicos	16
<b>CAPITULO II</b>	<b>17</b>
Marco Teórico	17
2.1. Antecedentes	17
2.2. Marco conceptual	20
2.2.1. <i>Inga edulis</i> Mart. “guaba”	20
2.2.1.1. Clasificación taxonómica	20
2.2.1.2. Distribución	20
2.2.1.3. Sinonimias	20
2.2.1.4. Nombres comunes	20
2.2.1.5. Descripción botánica	20
2.2.1.6. Origen	21
2.2.1.7. Ecología y adaptación	21
2.2.1.8. Fructificación y fenología	21
2.2.1.9. Disponibilidad de recursos genéticos	22
2.2.1.10. Valor nutricional	22
2.2.1.11. Propiedades medicinales	22
2.2.1.12. Forma de uso	23

2.2.2. <i>Artemia franciscana</i>	23
2.3. Hipótesis	25
2.4. Variables	26
2.4.1. Variable dependiente	26
2.4.2. Variable independiente	26
2.5. Operacionalización de variables	27
<b>CAPITULO III</b>	29
Metodología	29
3.1. Tipo de estudio	29
3.2. Diseño de la investigación	29
3.3. Población y Muestra	29
3.4. Procedimiento experimental	30
3.4.1. Preparación de los extractos hidroalcohólicos	30
3.4.2. Ensayo de citotoxicidad	30
3.4.2.1. Preparación de la muestra	30
3.4.2.1.1. Certificación de la especie vegetal	30
3.4.2.1.2. Animales de experimentación	30
3.5. Materiales, Equipos y Reactivos	32
3.5.1. Materiales	32
3.5.2. Equipos	32
3.5.3. Reactivos, insumos y drogas	32
3.6. Instrumento de recolección de datos	33
3.7. Procesamiento de la información	33
3.8. Consideraciones Éticas	33
<b>CAPITULO IV</b>	35
4.1. Resultados	35
4.1.1. Actividad citotóxica: Fruto inmaduro de <i>Inga edulis</i> Mart.	35
4.1.2. Actividad citotóxica: Hoja de <i>Inga edulis</i> Mart.	37
4.2. Discusión	40
4.3. Conclusiones	41
4.4. Recomendaciones	42
4.5. Referencias bibliográficas	43
4.6. Anexos	47



## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Fruto inmaduro. Cantidad de nauplios inyectados.	35
Tabla 2. Fruto inmaduro. Conteo de nauplios vivos y muertos de <i>Artemia franciscana</i> en las disoluciones	35
Tabla 3. Fruto inmaduro. Cálculo de la $CL_{50}$ a partir de la ecuación lineal: $y= 1.0951x + 6.3604$ , obtenida vía análisis Probit	37
Tabla 4. Hojas. Cantidad de nauplios incubados	37
Tabla 5. Hojas. Conteo de nauplios vivos y muertos de <i>Artemia franciscana</i> en las disoluciones	38
Tabla 6. Hojas. Cálculo de la $Cl_{50}$ a partir de la ecuación lineal: $y= 0.0474x + 3.2005$ , obtenida vía análisis Probit	39
Tabla 7. Comparación de $Cl_{50}$ de fruto inmaduro vs hojas de <i>Inga edulis</i> Mart.	39

## ÍNDICE DE GRAFICOS

	<b>Pág.</b>
Gráfico 1. Análisis Probit – fruto inmaduro de <i>Inga edulis</i> Mart.	36
Gráfico 2. Análisis Probit – hojas de <i>Inga edulis</i> Mart.	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1: Huevos	24
Figura 2: Rotura de la membrana	24
Figura 3: Estadío de gota (membrana de eclosión unida al corión)	24
Figura 4: Nauplio	24
Figura 5: Metanauplio (24H)	24
Figura 6: Metanauplio (48H)	24

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Flujo grama del ensayo de la actividad citotóxica	47
Figura 2. Esquema de dilución del extracto para el experimento	48
Figura 3. Configuración de esquema de experimento	48
Registro 1 Hoja de trabajo ensayo de toxicidad por <i>Artemia franciscana</i>	49
Registro 2 Hoja de trabajo conteo de larvas vivas / muertas de <i>Artemia franciscana</i> .	50
Registro 3: Constancia de certificación de la especie vegetal	50

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

ppm= partes por millón

FFB= Facultad de Farmacia y Bioquímica

CL<sub>50</sub>= Concentración letal media 50

IO= Instan Ocean

OMS= Organización mundial de la Salud

IE= *Inga edulis* Mart.

INIA= Instituto Nacional de Innovación Agraria

CATIE= Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza

H<sub>0</sub>= Hipótesis nula

H<sub>1</sub>= Hipótesis del investigador

K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>= Dicromato de potasio

DMSO=Dimetil Sulfóxido

Ups=unidades prácticas de salinidad

“Citotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y fruto inmaduro de *Inga edulis* Mart. Sobre *Artemia franciscana*”

FIORELLA DELFINA TORRES ROJAS y EDWARD JOAO SINTI OCHAVANO

**RESUMEN**

Determinar la actividad citotóxica *in vitro* de hojas y fruto Inmaduro de *Inga edulis* Mart. Procedente de la reserva comunal Tamshiyacu, Distrito Fernando Lores Tenazoa, Región Loreto. La muestra colectada y acondicionada, secada en un equipo deshumecedor a temperatura constante de 35 °C por seis días, que posteriormente fueron micropulverizadas. Se pesó 50 g y se maceró en solución etanol-agua (70:30), obteniéndose el extracto hidroalcohólico. Los quistes de *Artemia franciscana* fueron eclosionados a nauplios. Para la evaluación citotóxica, se etiquetaron 07 columnas con 03 tubos de ensayos respectivamente, que contenían 20 nauplios con el extracto en concentraciones de 1500 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 50 ppm y 10 ppm; más su respectivo control negativo (nauplios y solución IO 3% agregada) y control positivo que contenían 400 ppm de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Posteriormente, se cubrió con papel de aluminio (a todos los tubos de ensayo) y se colocó las lámparas de 20W a ambos lados durante 24 horas. La determinación de la actividad citotóxica se realizó a través del cálculo CL<sub>50</sub> vía análisis Probit, obteniéndose un Cl<sub>50</sub> de 0.05724 ppm para fruto inmaduro y 9.20662 ppm para hojas respectivamente. Se concluyó que el fruto inmaduro y hojas de *Inga edulis* Mart. presentan actividad citotóxica con un CL<sub>50</sub>=0,05724ppm y un CL<sub>50</sub>=9,20662 ppm respectivamente, ya que ambos valores son considerados como extremadamente tóxicos.

**Palabras claves:** *Inga edulis* Mart. Actividad citotóxica, *Artemia franciscana*

“*In vitro* cytotoxicity from the hydro – alcoholic extract of the imadure leaves and fruit of the species *Inga edulis* Mart. on *Artemia franciscana*”  
FIORELLA DELFINA TORRES ROJAS y EDWARD JOAO SINTI OCHAVANO

### ABSTRACT

To determine the *in vitro* cytotoxic activity of leaves and fruit immature de *Inga edulis* Mart. From the Tamshiyacu community reserve, Fernando Lores Tenazoa District, Loreto Region. The sample collected and conditioned, dried in a dehumidifying equipment at a constant temperature of 35 ° C for six days, which were subsequently micropulverized. 50 g was weighed and macerated in ethanol-water solution (70:30), obtaining the hydroalcoholic extract. The cysts of *Artemia franciscana* were hatched to nauplii. For the cytotoxic evaluation, 07 columns were labeled with 03 test tubes respectively, which contained 20 nauplii with the extract in concentrations of 1500 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 50 ppm and 10 ppm; plus its respective negative control (nauplii and solution IO 3% added) and positive control containing 400 ppm of K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Later, it was covered with aluminum foil (to all the test tubes) and the 20W lamps were placed on both sides for 24 hours. The determination of the cytotoxic activity was carried out through the LC<sub>50</sub> calculation via Probit analysis, obtaining an CL<sub>50</sub> of 0,05724 ppm immature fruit and 9,20662 ppm for leaves respectively.

It was concluded that the immature fruit and leaves of *Inga edulis* Mart. present cytotoxic activity with a LC<sub>50</sub> = 0.05724ppm and a LC<sub>50</sub> = 9.20662ppm respectively, since both values are considered as extremely toxic.

**Key Words:** *Inga edulis* Mart. Cytotoxic activity, *Artemia franciscana*.

## CAPITULO I

### 1.1 INTRODUCCION

El estudio de las propiedades curativas de la gran diversidad de plantas peruanas es hasta el momento incipiente, siendo el más bajo el de las especies con posible actividad antineoplásica. Las plantas superiores han sido una fuente útil de compuestos antitumorales de importancia clínica, en consecuencia, es importante estudiar los productos de origen natural mediante modelos *in vitro* y/o *in vivo*, entre los que se destacan los ensayos de citotoxicidad como uno de los indicadores de actividad antitumoral inicial <sup>(1)</sup>.

En la última década, se han incorporado algunos ensayos de gran utilidad y eficacia que requieren pequeñas cantidades de muestras y permiten la evaluación rápida de extractos crudos y fracciones, conduciendo con seguridad a los principios activos <sup>(2,3)</sup>.

Un lugar sobresaliente dentro del grupo de bioensayos más utilizados lo ocupa el ensayo de *Artemia* spp. Este es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los materiales en larvas de *Artemia* spp., y de esta manera se predice su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos y/o ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos <sup>(2, 3,4)</sup>.

Dentro de la investigación citotóxica que presentan los extractos de las especies vegetales en estudio sobre los nauplios de *Artemia* spp., se incluyen: la determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) con la finalidad de conocer la concentración que producirá un efecto tóxico en el 50% de la especie en experimentación y visualizar la relación riesgo-beneficio que implicará el uso de estos extractos vegetales como alternativa medicinal <sup>(1)</sup>.



Muchas especies leguminosas del género *Inga*, tienen un fruto comestible, apetecible por la pulpa dulce que rodea las semillas, tal es el caso de *Inga edulis* Mart.; éstas constituyen el mayor recurso arbóreo en sistemas agroforestales, con una amplia distribución en la Región Loreto, siendo importante, que además de los usos tradicionales, se considere la posibilidad del procesamiento de los frutos inmaduros (20-40cm) y de sus hojas para evaluaciones de citotoxicidad en extractos vegetales, ya que los mismos son de suma importancia porque nos permitirá generar la información base sobre estudios de letalidad en microorganismos.

Es por ello que el presente trabajo de investigación, planteó el análisis de actividad citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y fruto inmaduro de *Inga edulis* Mart. sobre *Artemia franciscana*.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo General

- Analizar la actividad citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y fruto inmaduro de *Inga edulis* Mart. sobre *Artemia franciscana*.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar la actividad citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y fruto inmaduro de *Inga edulis* Mart. sobre *Artemia franciscana* a diferentes concentraciones 1500 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 50 ppm y 10 ppm.
- b) Determinar la  $CL_{50}$  *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y fruto inmaduro de *Inga edulis* Mart. sobre *Artemia franciscana*, vía análisis Probit.
- c) Comparar las  $CL_{50}$  de hojas y fruto inmaduro de *Inga edulis* Mart., identificándose así la de mejor actividad citotóxica *in vitro*.

## CAPITULO II

### MARCO TEORICO

#### 2.1. ANTECEDENTES

**Galvis H. et al (2012)**, evaluaron la actividad tóxica de los extractos de la corteza de *Annona cherimolioides* (annonaceae) sobre *Artemia salina*. Aplicaron cromatografía de columna y cromatografía encapa preparativa para la extracción y aislamiento de los alcaloides presentes en la corteza de *Annona cherimolioides*, todos estos a partir de extractos, fracciones y compuestos depurados de tipo alcaloidal. Obtuvieron un compuesto depurado, del mismo determinaron la presencia de un núcleo aporfínico según resonancia magnética nuclear 1-H y espectrofotometría. Concluyeron que el extracto crudo mostró mayor toxicidad sobre *Artemia salina* (< 250 ppm), debido al sinergismo de los alcaloides presentes en tal extracto y a las propiedades farmacológicas atribuidas al núcleo aporfínico presente en los extractos, fracciones y compuestos depurados<sup>(5)</sup>.

**Medina C. et al. (2012)**, evaluaron el efecto de la presencia de bacterias asociadas a quistes, en la sobrevivencia y desarrollo de larvas de *Artemia franciscana*. Utilizaron como metodología el aislamiento, el cultivo y la preservación en nitrógeno líquido de cepas bacterianas por métodos fenéticos, y la sobrevivencia del desarrollo larval de *Artemia franciscana* en reto a 6 días de cultivo monoxénico y dixénico, con cepas bacterianas *Microbacterium*(cepas 8L, 8R), *Exiguobacterium*(cepa 8N) y *Vibrio parahaemolyticus* 588 (de la CECT) utilizando levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) estéril como alimento. Concluyeron que la cepa 8R y *Vibrio para haemolyticus* afectaron negativamente la sobrevivencia de *Artemia*. Las cepas 8L y 8N fueron inócuas para la sobrevivencia, crecimiento y desarrollo de *Artemia*; reportaron que la mezcla de las dos últimas cepas bacterianas (cultivo dixénico) resultó con efecto positivo para el crecimiento y desarrollo de *Artemia*. Asimismo, proponen que las cepas 8L y 8N son bacterias con potencial para ser utilizadas como agentes prebióticos en el cultivo larvario de *Artemia*<sup>(6)</sup>.

**Pacheco J. (2011)**, determinó la toxicidad aguda ( $CL_{50}$ ) del extracto del polvillo de carbón frente a larvas de *Artemia franciscana*; logrado mediante la exposición de las mismas a diferentes concentraciones del extracto (1,25 mg/L, 2,5 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L), utilizaron como blanco dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración de 20 mg/L; y, obtuvo valores de  $CL_{50}$  de 8,89 mg/L y 4,20 mg/L tras exposiciones de 24 y 48 horas respectivamente. Utilizó como metodología método Probit. Concluyó que el polvillo de carbón es una sustancia potencialmente citotóxica al mostrar una  $CL_{50}$  menor a 10 mg/L, indicando el grado de peligrosidad de dicho material, especialmente para los ecosistemas marinos y/o estuarinos (hábitat de *A. franciscana*) <sup>(7)</sup>.

**Martínez M. et al. (2011)**, determinaron la actividad antibacteriana y citotóxica *in vivo* de los extractos alcaloidales de *Bauhinia variegata* L. Utilizaron cromatografía de columna para la extracción y el aislamiento de los alcaloides presentes en las hojas de *B. variegata*, el potencial citotóxico de los extractos y fracciones alcaloidales por medio del bioensayo sobre "camarones de mar" (*Artemia salina*) y la actividad antibacterial sobre *Escherichia coli* por método de difusión en disco (antibiograma por difusión). Obtuvieron seis compuestos purificados, a los cuales determinaron la presencia del núcleo protoberberínico según espectrofotometría ultravioleta; en relación con el bioensayo sobre *Artemia salina*, el extracto crudo mostró ser prácticamente no tóxico ( $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ ), mientras que la fracción de los alcaloides totales y el compuesto CD1 demostró ser altamente tóxico ( $CL_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$ ). Concluyeron que la actividad citotóxica reportada se debe al efecto sinérgico del conjunto de metabolitos secundarios que pudieron evidenciarse en la planta y a los cuales también se les reconoce esta actividad (alcaloides y terpenos), que explica así la toxicidad mostrada por la fracción de los alcaloides totales <sup>(8)</sup>.

**Cavada, B. et al (2010)**, evaluaron la toxicidad de las lectinas vegetales de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda*, *Dioclea guianensis*, *Dioclea grandiflora* y *Dioclea virgata* a *Biomphalaria glabrata* Say y *Artemia salina*.

Utilizaron como metodología para el potencial citotóxico de los extractos el bioensayo sobre "camarones de mar" (*Artemia salina*). Concluyeron que todas las muestras fueron tóxicas para *Artemia salina*, algunas de ellas con valores de concentración letal que mata al 90% de la población (LC (90)) <10 µg/mL (-1). Asimismo, son activos contra *B. glabrata* Say, matando al 100% de los caracoles adultos, a una concentración de 50 microg/mL (-1). Las lectinas *Cratylia floribunda* y *Dioclea guianensis* tienen propiedades letales para los moluscos, con valores de LC (90) = 50,3 microg/mL (-1) y LC (90) = 41,0 microg/mL (-1), respectivamente <sup>(9)</sup>.

## 2.2. MARCO CONCEPTUAL

### 2.2.1 *Inga edulis* Mart. “guaba”.

#### 2.2.1.1 Clasificación taxonómica <sup>(10)</sup>

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Fabales
Familia	:	Fabaceae
Género	:	<i>Inga</i>
Especie	:	<i>Inga edulis</i> Mart.

#### 2.2.1.2 Distribución

América tropical y subtropical.

#### 2.2.1.3 Sinonimias

*Inga edulis* Mart. var. *edulis*, *Inga edulis* Mart. var. *parviflora* Benth

#### 2.2.1.4 Nombres comunes

Guaba, pacaé.

#### 2.2.1.5 Descripción botánica

Es un árbol con 8 a 15 m de altura, tronco bajo, ramificando algunas veces casi desde la base, copa algo rala. Hojas compuestas pinnadas, raquis alado con cuatro a seis pares de folíolos subsésiles, elípticos u ovalados, los inferiores siempre más pequeños, base obtusa o redondeada, nervaduras laterales paralelas y presencia de glándulas interpeciolares. Inflorescencias terminales o subterminales agrupadas en las axilas de las hojas. Flores con cáliz verdoso y corola blanquecina, perfumadas, sésiles, agrupadas en el ápice del raquis. El fruto es una vaina cilíndrica indehiscente, de color verde, multisureado longitudinalmente y de largo variable, pudiendo llegar hasta un metro. Las semillas son negras de 3 cm de longitud, con un rango entre 1,4 y 4,5 cm, cubiertas por una pulpa (arilo) blanca, suave y azucarada <sup>(11)</sup>.

#### **2.2.1.6 Origen**

Planta que se encuentra silvestre en la Amazonia, América Central y las Indias Occidentales. Por la alta variabilidad existente y por el alto número de especies de *Inga spp.*, probablemente tenga como centro de distribución la región amazónica <sup>(11)</sup>.

#### **2.2.1.7 Ecología y adaptación**

Planta adaptada a las condiciones de climas tropicales y subtropicales, a climas con temperaturas medias iguales o superiores a 20°C, siempre y cuando no existan heladas; adaptada a condiciones de precipitación entre 1,000 y más de 5,000 mm, suelos ácidos con pH 4,0 y alta saturación con aluminio y aun en condiciones de suelos de desierto que han sido incorporados en sistemas de riego. Se le encuentra distribuida en toda América del Sur tropical, desde el océano Pacífico al Atlántico, aunque solamente en la región amazónica existe de manera natural. Otras especies del género *Inga* son cultivadas desde tiempo precolombino en la costa peruana <sup>(11)</sup>.

#### **2.2.1.8 Fructificación y Fenología**

Se inicia a los tres a cuatro años, aumentando hasta el año ocho a diez en que alcanza el máximo. La vida útil de una planta es estimada en 20 años. No se tiene datos de productividad por planta. La fenología varía según la zona y según las especies. Las *ingas* fructifican en Brasil desde setiembre a junio; mientras que en Colombia y Perú se encuentran frutos entre febrero y diciembre. En plantas con nueve años de edad, la producción de frutos está alrededor de 45 kg/árbol. En la región de Belén, Brasil y en muchas otras zonas de la Amazonia, la producción se distribuye en todos los meses del año, excepto enero, con mayor concentración en mayo, julio, octubre y noviembre<sup>(11)</sup>.

### 2.2.1.9 Disponibilidad de recursos genéticos

El INIA - Perú tiene instalada, en la estación experimental de Yurimaguas, una colección de gerinoplasma de la Amazonia peruana consistente de 53 entradas identificadas a nivel de género y especie, correspondiendo 13 de ellas a *Inga edulis* Mart.. Estas entradas proceden de 350 árboles muestreados y marcados. Un banco similar existe en el CATIE - Costa Rica <sup>(11)</sup>.

### 2.2.1.10 Valor nutricional

Valor nutricional de 10g de pulpa de guaba <sup>(11)</sup>.

<u>Unidad</u>	<u>Valor</u>
Agua	84,9 mg
Valor energético	53,0 cal
Proteínas	1,0 g
Aceite	0,1 g
Carbohidratos	13,6 g
Fibras	0,8 g
Calcio	24 mg
Fósforo	18 mg
Fierro	0,4 mg
Tiamina	0,05 mg
Riboflavina	0,10 mg
Niacina	0,50 mg
Ac. Ascórbico	1,40 mg

### 2.2.1.11 Propiedades medicinales:

Las semillas y las hojas se utilizan en la medicina tradicional como astringente en las enfermedades intestinales y como antirreumático.

El té hecho de la corteza es utilizado para acelerar la labor de parto y la pulpa fresca ayuda a curar la constipación.

“Otros”: los frutos inmaduros lo utilizan como alternativa para tratamiento de la Diabetes mellitus tipo 2<sup>(11)</sup>.



### **2.2.1.12 Forma de uso**

Cocción e infusión

### **2.2.2 Artemia franciscana**

*Artemia franciscana* es una especie primitiva de crustáceo perteneciente al orden anostraca, distribuida en los lagos de agua salada y mares de todo el mundo y está adaptada a sobrevivir en cuerpos de agua que sufren grandes variaciones de sal que van desde 5 a 150 ups (unidades prácticas de salinidad) <sup>(12)</sup>.

Esta especie es capaz de depositar huevos que constan de un quiste integrado por aproximadamente 4000 células, las cuales le confieren gran resistencia en condiciones extraordinarias de estrés fisiológico<sup>(13)</sup>. Mientras los huevos permanezcan bajo condiciones de estrés, estarán metabólicamente inactivos (letargo); una vez dadas las condiciones ambientales específicas, los huevos reanudan su metabolismo y desarrollo, hasta finalmente emerger en forma de nauplios <sup>(14)</sup>.

El desarrollo del embrión hasta la eclosión dura aproximadamente 24 horas en condiciones adecuadas, llegando a su fase adulta en 20-30 días de vida libre, favoreciendo su uso en estudios de toxicidad aguda <sup>(15)</sup>.

En general las especies pertenecientes al orden anostraca poseen un cuerpo dividido en cabeza, tórax y abdomen, con apéndices torácicos no especializados y semejantes entre sí, mientras que el abdomen carece de los mismos. Los dos segmentos posteriores del tórax corresponden a la zona genital, mientras que el abdomen corresponde a seis segmentos posteriores a esta y concluye con el telson, el cual a su vez lleva un par de furcas caudales en su fin.

En la cabeza de los adultos pueden observarse un par de ojos compuestos y uno simple, los nauplios por su parte, constan de un ojo medial hacia el final anterior denominado ojo naupliar.

El apéndice del primer segmento de la cabeza es el primer par de antenas, las cuales no son articuladas y presentan quimio-sensores. Seguidamente pueden observarse un segundo par de antenas de mayor tamaño que las primeras, estas presentan dimorfismo sexual en adultos y actúan como aparato de locomoción en los primeros estadios larvarios <sup>(16)</sup>.

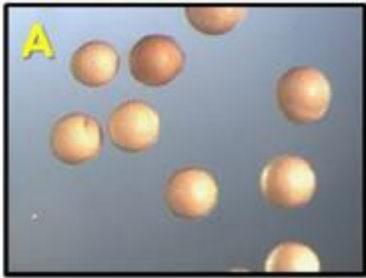


Figura 1: Huevos



Figura 2: Rotura de la membrana



Figura 3: Estadío de gota

(Membrana de eclosión

Unida al corión).



Figura 4: Nauplio



Figura 5: Metanauplio (24h).



Figura 6: Metanauplio (48h).

Diferentes estadios del ciclo de vida de *Artemia franciscana* vista en estereomicroscopio (3X)

Fuente: Sorgeloos P (1978)

### 2.3. HIPÓTESIS

Ho: Los extractos hidroalcohólico de las hojas y fruto inmaduro de *Inga edulis* Mart. no presentan actividad citotóxica *in vitro* sobre *Artemia franciscana*.

Ha: Los extractos hidroalcohólico de las hojas y fruto inmaduro de *Inga edulis* Mart. presentan actividad citotóxica *in vitro* sobre *Artemia franciscana*.

## 2.4 VARIABLES

### 2.4.1 Variable dependiente

Actividad citotóxica *in vitro* sobre *Artemia franciscana*.

Indicador:

- Concentración letal (CL<sub>50</sub>).

### 2.4.2 Variable independiente

Extracto hidroalcohólico de hojas y fruto inmaduro de *Inga edulis* Mart.

Indicador:

- Concentraciones 10ppm, 50ppm, 500ppm, 1000ppm y 1500ppm

Clasificación de toxicidad según CYTED <sup>(18)</sup>

GRUPO	CATEGORIA	ESCALA (ug/mL)
I	Extremadamente tóxico	1 – 10
II	Altamente tóxico	10 – 100
III	Moderadamente tóxico	100 – 500
IV	Ligeramente tóxico	500 – 1000
V	Prácticamente no tóxico	1000 – 1500
VI	Relativamente inocuo	>1500

Fuente: Journal Ethnopharmacol. 2011 September 1; 137(1): 121–140.  
doi:10.1016/j.jep.2011.04.071.

## 2.5. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA
Actividad citotóxica <i>in vitro</i> sobre <i>Artemia franciscana</i>	Ensayo donde se evalúa la citotoxicidad de un tratamiento, en términos de concentraciones letales (CL <sub>50</sub> ).	Ensayo para determinar el potencial citotoxicidad que presentan experimentalmente los extractos de las especies vegetales sobre nauplios de <i>Artemia</i> spp., a fin de conocer la concentración que producirá un efecto tóxico en el 50% de la especie en estudio y visualizar la relación riesgo-beneficio que implicará el uso de estos extractos vegetales como alternativa medicinal.	Concentración letal(CL <sub>50</sub> ).	Citotóxico: 1 – 1000 ug/mL.  No citotóxico: >1000 ug/mL.	Racional. Tipo: Cuantitativo

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA
Extracto hidroalcohólico de hojas y fruto inmaduro de <i>Inga edulis</i> Mart.	Producto con diversos Compuestos químicos, obtenido por maceración, filtrado, evaporado (solvente) y llevado hasta sequedad.	Material vegetal seco micropulverizado a la cual se adiciona Alcohol – agua (7:3), sometida a maceración por 7 días, filtrado, concentrado en rota vapor a 40° C y a 40 rpm, la misma que se colocará en una estufa a 40°C hasta sequedad y luego refrigerado, hasta su posterior uso en los ensayos.	Concentraciones: 10ppm, 50ppm, 500ppm, 1000ppm y 1500ppm	Con actividad Sin actividad	Racional Tipo : Cuantitativo

## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA

#### 3.1. Tipo de estudio

- Prospectivo: porque en el registro de la información se tomaron en cuenta los hechos a partir de la fecha de estudio.
- Longitudinal: porque se estudiaron las variables a lo largo del tiempo durante el periodo de investigación.

#### 3.2. Diseño de la investigación

Experimental: porque se midió el tiempo de exposición de los nauplios de *Artemia franciscana* en los extractos vegetales.

#### 3.3. Población y muestra

Población vegetal: Hojas y fruto inmaduro de la especie vegetal.

Muestra vegetal: *Inga edulis* Mart.

Criterios de Inclusión vegetal:

- Fruto inmaduro limpio y en buen estado de conservación.
- Hojas enteras.

Criterios de exclusión vegetal:

- Fruto inmaduro deteriorado y/o malogrado.
- Hojas enteras que evidencien contaminación e infección.

Población animal: Constituida por quistes, que luego del proceso de eclosión se convirtieron en nauplios de *Artemia franciscana*.

Criterios de inclusión animal

- Nauplios.

Criterios de exclusión animal

- Quistes inviábiles.

### 3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

#### 3.4.1 Preparación de los extractos hidroalcohólicos

- El material vegetal seco se picó y molió para luego proceder a la preparación del extracto hidroalcohólico 70:30 (Alcohol – agua), c.s.p cubrir la muestra, es decir: 50 g de material vegetal micropulverizado en 500 mL de alcohol-agua (70:30)
- Después, se sometió a maceración durante 07 días.
- Posteriormente, el extracto macerado se filtró con ayuda de una bomba al vacío. Se concentró con la ayuda del equipo rota vapor a 40° C y a 40 rpm.
- El extracto obtenido en el rota vapor, se colocó en una estufa a 40°C por 24 horas hasta sequedad y posteriormente se refrigeró para su uso en los respectivos ensayos.

#### 3.4.2. Ensayo de citotoxicidad<sup>(14,15)</sup>

##### 3.4.2.1 Preparación de la muestra

###### 3.4.2.1.1 Certificación de la especie vegetal

La especie vegetal colectada, fue llevada al Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de Amazonia Peruana – UNAP; la misma que certificó y entregó una constancia con su respectivo código de identificación (anexo 6).

###### 3.4.2.1.2 Animales de experimentación

Especie animal:

Nauplios de *Artemia franciscana*.

Condiciones de mantenimiento de los camarones de experimentación:

En un vaso precipitado de vidrio de 1000mL, se preparó una solución de Instant Ocean 3% disolviendo 30 gramos de sal de IO (Instant Ocean) en 1000 mL de agua destilada. De ésta solución preparada, se extrajo 30 mL de solución IO 3%.

Se agregó 0.1g de quistes de *Artemia franciscana* y se dejó en reposo por un lapso de 15 minutos (proceso importante para poder descartar los quistes



inviabiles). Luego, se agregó 370 mL de solución de IO para su hidratación a temperatura 25°C por 1 hora. Después, se colocó un pelele acuatico (motor que es el encargado de dar aireación) en el vaso precipitado para la aireación (utilizando cinta adhesiva para fijar y cubrir con un papel de aluminio el recipiente), se colocó dos lámparas pequeñas de 20W a menos de 5 cm de cada lado del frasco para una iluminación uniforme. Incubación a temperatura 25°C por 48 horas.

Condiciones ambientales para los quistes de experimentación:

Fueron monitoreados mediante un medidor de temperatura en el laboratorio entre 22 y 29° C, la iluminación fue permanente con dos lámparas de 20W.

Tratamiento y evaluación de grupos experimentales: (anexos 2 y 3)

Se apaga el pelele y una de las lámparas de luz de manera que los nauplios se congreguen para el lado iluminado del vaso precipitado. Después, se etiquetó los tubos de ensayos; colocando 07 columnas de tubos de ensayos etiquetados: A1-A3, B1-B3, C1-C3, D1-D3 y E1-E3 (cada uno de ellos tuvo los nauplios con el extracto a evaluar. Los tubos de ensayos F1 – F3 fueron controles negativos con sólo los nauplios y solución IO agregada; los tubos de ensayos G1 – G3 fueron controles positivos en el que se añadieron 400 ppm de  $K_2Cr_2O_7$ .

Luego, se preparó la solución madre del extracto a evaluar en una concentración de 2000 ppm, siendo un extracto esterilizado purificado; se preparó a partir de ella nuevas concentraciones: 1500 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 50 ppm y 10 ppm.

Cada concentración preparada, fue por triplicado.

Para todos los tubos de ensayos, se sembraron 20 nauplios, posteriormente se cubrió con papel de aluminio (a todos los tubos de ensayo) y se colocó las lámparas de 20W a ambos costado durante 24 horas.

Determinación cuantitativa de supervivencia de nauplios: (anexos 4 y 5)

Fueron contados después de 24 horas de exposición al extracto evaluado.

Se transfirió el contenido de todos los tubos de ensayo (de uno en uno) a un pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 12 pocillos, después se enjuagó el

tubo con una pequeña cantidad de agua (si es necesario) para asegurar que todos los camarones fueron transferidos. Se contó los nauplios bajo un equipo de video de alta resolución (filmadora), registrando así cantidades de nauplios muertos y vivos por separado. Moribundo (gravemente enfermo y a punto de morir o extremadamente letárgico) tuvo que ser considerado vivo.

Se registró el número de camarones vivos y muertos en la hoja de datos y el cálculo de la diferencia de la cantidad inicial de camarones añadido, se repitió este procedimiento para todos los tubos, la eliminación de los contenidos del pozo cada vez. Se enjuagó bien con la solución IO y después se limpió, con una pisceta cada tubo de ensayo.

### **3.5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS**

#### **3.5.1. Materiales**

Material vegetal: Hojas y fruto inmaduro de *Inga edulis* Mart.

Material biológico y otros: Nauplios de *Artemia franciscana*

Material de laboratorio: Mascarillas descartables, guantes descartables, tubo de vidrio boro 3,3 16x100mm Pirex, papel toalla, Micropipeta automática 100-1000ul, lentes de protección, cubre calzados, gorros, Vaso de vidrio graduado Boro 3,3 600ml, mandilones, Vaso de vidrio graduado Boro 3.3 50ml, papel filtro, parafilm 2 x 250', tips punta amarillo 1-200 ul, tips punta azul 200-1000 ul, peles, lámparas, equipo de venoclisis.

Material de escritorio: Libreta de campo, plumón marcador, papel de despacho, porta minas, lapicero artline, papel A4.

3.5.2. Equipo: Balanza analítica, potenciómetro, destilador de agua, desionizador, rota vapor, bomba de vacío.

3.5.3. Reactivos, insumos y drogas: Agua destilada estéril, alcohol 96°, Solución I.O., Quistes de *Artemia franciscana*, Dicromato de potasio.

### **3.6. INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

Tarjetas de registro de farmacología (anexos 4 y 5)

Se registró el número de camarones vivos y muertos en la hoja de datos y el cálculo de la diferencia de la cantidad inicial de camarones añadido, se repitió este procedimiento para todos los tubos, la eliminación de los contenidos del pozo cada vez. Se enjuagó bien con la solución IO y después se limpió, con una peseta cada tubo de ensayo.

### **3.7. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN**

Los resultados medios de la mortalidad del nauplios de salmuera se representaron frente a los logaritmos de las concentraciones utilizando la herramienta de Análisis Probit del software estadístico SPSS, de la que la mediana letal concentración ( $CL_{50}$ ) en intervalos de confianza del 95% (IC) se calculará con el método de Finney (1971)<sup>(14,15)</sup>. La actividad biológica usando el ensayo del camarón de salmuera se registró como la concentración cuando el 50% de los nauplios murieron dentro de las 24 h de contacto con el extracto evaluado. Los valores  $CL_{50}$  de 1 – 10 ug/mL (extremadamente tóxico); 10 – 100 ug/mL (altamente tóxico); 100 – 500 (moderadamente tóxico); 500 – 1000 ug/mL (ligeramente tóxico); 1000 – 1500 ug/mL (prácticamente no tóxico) y > 1500 ug/mL (relativamente inócuo) según Clasificación de toxicidad CYTED descrita en la página 24.

### **3.8. CONSIDERACIONES ETICAS**

La utilización de animales en pruebas de laboratorio es diferente a la experimentación animal en el sentido de que el principal objetivo de las pruebas es establecer si un producto es seguro para su uso (por ejemplo, las vacunas, los fármacos biológicos entre otros). Dentro de esta problemática, cada día más apasionante de los animales de laboratorio, son, con toda seguridad, los aspectos relacionados con la ética de su utilización los que se encuentran sometidos a críticas dispares y conflictivas.

Es por ello que los científicos conscientes de su responsabilidad, que naturalmente es la nuestra y que podría quedar planteada en el siguiente concepto pragmático: Los animales de laboratorio pueden y deben ser

utilizados como reactivos biológicos y ecológicos, en beneficio de la ciencia y la salud pública, siempre que no se cuente con otras técnicas que los puedan sustituir, aunque sean muy sofisticados, sin olvidar que se trata de seres vivos, que sienten y sufren dolor.

Por tanto se ha de procurar que el sufrimiento sea el menor posible; en una palabra el investigador debe actuar en este caso con una rigurosa ética de “deber y responsabilidad” con respecto a los animales, tanto en cría y manejo, como en las practicas experimentales a que necesariamente deben ser sometidos <sup>(19)</sup>.

Dentro de este contexto la presente investigación en enmarca en los principios expuestos en 1959 por Rusell y Burch, en su interesante publicación “The principles of humane experimental Technique”, que pueden resumirse en la obligación que tienen los investigadores de solo utilizar los animales imprescindibles, manipularlos con sentido ético de responsabilidad y sobre todo, evitar, siempre que no perjudique la experiencia, el más mínimo dolor, empleando para ello los analgésicos más convenientes en cada caso.

## CAPITULO IV

### 4.1 RESULTADOS

#### 4.1.1. Actividad citotóxica: Fruto inmaduro de *Inga edulis* Mart.

**Tabla 1.** Cantidad de nauplios inyectados

Muestra	Extracto hidroalcohólico del fruto inmaduro de <i>Inga edulis</i> Mart.													
	10	50	500	1000	1500	I.O 3%	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>							
Concentraciones	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	(-)	400	ppm (+)						
Repeticiones														
1° réplica A	A <sub>1</sub>	20	B <sub>1</sub>	20	C <sub>1</sub>	20	D <sub>1</sub>	20	E <sub>1</sub>	20	F <sub>1</sub>	20	G <sub>1</sub>	20
2° réplica B	A <sub>2</sub>	20	B <sub>2</sub>	20	C <sub>2</sub>	20	D <sub>2</sub>	20	E <sub>2</sub>	20	F <sub>2</sub>	20	G <sub>2</sub>	20
3° réplica C	A <sub>3</sub>	20	B <sub>3</sub>	20	C <sub>3</sub>	20	D <sub>3</sub>	20	E <sub>3</sub>	20	F <sub>3</sub>	20	G <sub>3</sub>	20
TOTALES	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60

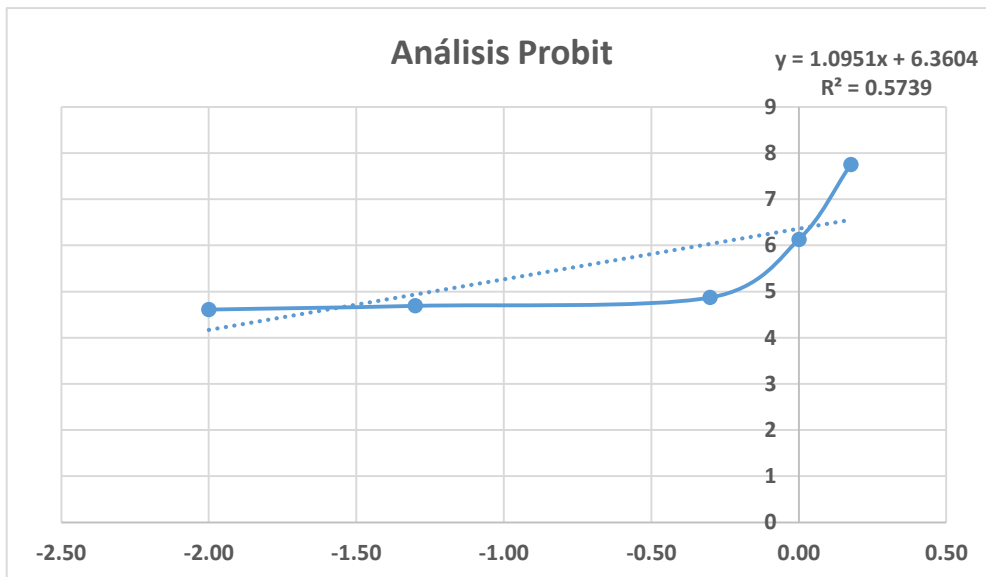
La tabla 1 muestra la cantidad de nauplios de *Artemia franciscana* inyectados en cada tubo de ensayo haciendo un total de 60 por cada una de las concentraciones evaluadas, más su respectivo control negativo y control positivo; todas ellas evaluadas en un tiempo de 24 horas.

**Tabla 2.** Conteo de nauplios vivos y muertos de *Artemia franciscana* en las disoluciones

[ ]	Repeticiones	Total	Nauplios de <i>Artemia</i>	
			Vivos	Muertos
10 ppm	A1, A2, A3	60	39	21
50 ppm	B1, B2, B3	60	37	23
500 ppm	C1, C2, C3	60	33	27
1000 ppm	D1, D2, D3	60	14	46
1500 ppm	E1, E2, E3	60	2	58
I.O. 3% (-)	F1, F2, F3	60	60	0
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	G1, G2, G3	60	0	60
400 ppm (+)				

La tabla 2 muestra la cantidad de nauplios vivos y muertos después de 24 horas expuestas al extracto por cada una de las concentraciones evaluadas, donde se evidencia un total de 21 nauplios muertos para la concentración de 10; 23 nauplios muertos para la concentración de 50 ppm; 27 nauplios muertos para la concentración de 500 ppm; 46 nauplios muertos para la concentración de 1000 ppm y 58 nauplios muertos para la concentración de 1500 ppm. Asimismo, el control negativo (solución I.O.) no muestra ningún nauplio muerto y el control positivo ( $K_2Cr_2O_7$  400 ppm) presenta 60 nauplios muertos, es decir, toda la cantidad de nauplios evaluados.

Gráfico 1: Análisis Probit – fruto inmaduro de *Inga edulis* Mart.



El gráfico 1, muestra el valor de  $R^2$  según resultados de las concentraciones ensayadas a los nauplios durante 24 Horas de exposición.

**Tabla 3.** Cálculo de la CL<sub>50</sub> a partir de la ecuación lineal:  $y= 1.0951x + 6.3604$ , obtenida vía análisis Probit

Extracto	Ecuación	R <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (ppm)
Hidroalcohólico de fruto inmaduro de <i>Inga edulis</i> Mart.	$y= 1,0951x + 6,3604$	0,5739	<b>0,05724</b>

La tabla 3, muestra el valor de CL<sub>50</sub> del fruto inmaduro de *Inga edulis* Mart.

#### 4.1.2. Actividad citotóxica: Hojas de *Inga edulis* Mart.

**Tabla 4.** Cantidad de nauplios inyectados

Muestra	Extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Inga edulis</i> Mart.							
	10	50	500	1000	1500	I.O 3%	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	
Concentraciones	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	(-)	400 ppm (+)	
Repeticiones								
1° réplica A	A <sub>1</sub> 20	B <sub>1</sub> 20	C <sub>1</sub> 20	D <sub>1</sub> 20	E <sub>1</sub> 20	F <sub>1</sub> 20	G <sub>1</sub> 20	20
2° réplica B	A <sub>2</sub> 20	B <sub>2</sub> 20	C <sub>2</sub> 20	D <sub>2</sub> 20	E <sub>2</sub> 20	F <sub>2</sub> 20	G <sub>2</sub> 20	20
3° réplica C	A <sub>3</sub> 20	B <sub>3</sub> 20	C <sub>3</sub> 20	D <sub>3</sub> 20	E <sub>3</sub> 20	F <sub>3</sub> 20	G <sub>3</sub> 20	20
TOTALES	60	60	60	60	60	60	60	60

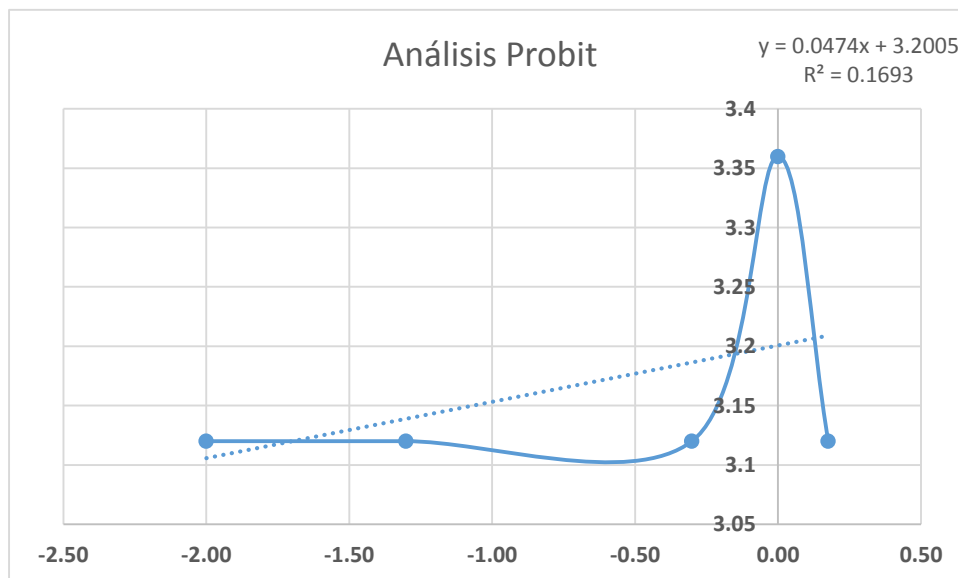
La tabla 4 muestra la cantidad de nauplios de *Artemia franciscana* inyectados en cada tubo de ensayo haciendo un total de 60 por cada una de las concentraciones evaluadas, más su respectivo control negativo y control positivo; todas ellas para ser evaluadas en un tiempo de 24 horas.

**Tabla 5.**Conteo de nauplios vivos y muertos de *Artemia franciscana* en las disoluciones

[ ]	Repeticiones	Nauplios de <i>Artemia</i>		
		Total	Vivos	Muertos
10 ppm	A1, A2, A3	60	58	2
50 ppm	B1, B2, B3	60	58	2
500 ppm	C1, C2, C3	60	58	2
1000 ppm	D1, D2, D3	60	57	3
1500 ppm	E1, E2, E3	60	58	2
I.O. 3% (-)	F1, F2, F3	60	60	0
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 400 ppm (+)	G1, G2, G3	60	0	60

Tabla 5, muestra la cantidad de nauplios vivos y muertos después de 24 horas expuestas al extracto por cada una de las concentraciones evaluadas, donde se evidencia un total de 2 nauplios muertos para las concentraciones de 10, 50, 500 y 1500 ppm respectivamente; 3 nauplios muertos para la concentración de 1000 ppm. Asimismo, el control negativo (solución I.O.) no muestra ningún nauplio muerto y el control positivo (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>400 ppm) presenta 60 nauplios muertos, es decir, toda la cantidad de nauplios evaluados.

Gráfico 2: Análisis probit – hojas de *Inga edulis* Mart.



El gráfico 2, muestra el valor de R<sup>2</sup> según resultados de las concentraciones ensayadas a los nauplios durante 24 Horas de exposición.



**Tabla 6.** Cálculo de la CL<sub>50</sub> a partir de la ecuación lineal:  $y = 0.0474x + 3.2005$ , obtenida vía análisis Probit

Extracto	Ecuación	R <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (ppm)
Hidroalcohólico de hojas de <i>Inga edulis</i> Mart.	$y = 0,0474x + 3,2005$	0,1693	<b>9,20662</b>

La tabla 6 muestra el valor de CL<sub>50</sub> de las hojas de *Inga edulis* Mart.

**Tabla 7.** Comparación de CL<sub>50</sub> de fruto inmaduro vs hojas de *Inga edulis* Mart.

Extracto	Ecuación	R <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (ppm)
Hidroalcohólico de fruto inmaduro de <i>Inga edulis</i> Mart.	$y = 1,0951x + 6,3604$	0,5739	<b>0,05724</b>
Hidroalcohólico de hojas de <i>Inga edulis</i> Mart.	$y = 0,0474x + 3,2005$	0,1693	<b>9,20662</b>

La Tabla 7, muestra los valores de CL<sub>50</sub> de fruto inmaduro y hojas de *Inga edulis* Mart., donde se puede notar que el fruto inmaduro presenta menor CL<sub>50</sub> en comparación de las hojas, identificándose así como la de mejor actividad citotóxica *in vitro*.

## 4.2. DISCUSION

Desde 1982, se han venido desarrollando bioensayos para la determinación de citotoxicidad con la utilización de *Artemia spp*, la misma que es usada para el tamizaje toxicológico de extractos de elevada toxicidad. **Galvis J. et al (2012)**<sup>(5)</sup> evaluaron la actividad tóxica de los extractos de diferente polaridad obtenidos de la corteza de *Annona cherimolioides*, donde el extracto crudo mostró toxicidad sobre *Artemia salina* con un  $CL_{50} < 250$  ppm, valor similar a lo obtenido en nuestra investigación y siendo éste considerado como bioactivo.

En la evaluación de la toxicidad de los extractos de la especie vegetal sobre *Artemia franciscana*, nuestro estudio muestra un valor de  $CL_{50} = 0,05724$  ppm para fruto inmaduro y un valor de  $CL_{50} = 9,20662$  ppm para hojas de *Inga edulis* Mart. y esto concuerda con lo declarado por Meyer *et al* 1982 <sup>(20)</sup>, “un valor de  $CL_{50}$  inferior a 1000 ug /ml se considera bioactivo”; y, en sentido puede tener actividad biológica.

Asimismo, concuerda con el “estudio toxicológico y teratogénico del extracto metanólico de *Cinnamomun zeylanicum* (canela), realizado por **Huamán S. et al (2003)**<sup>(21)</sup>, en cuanto al bioensayo de toxicidad en *Artemia salina* en donde la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de canela fue de 320 ug/ml, lo cual indica que la canela tiene actividad tóxica y se considera bioactivo; además concuerda con lo declarado por Lucy Ibáñez Vásquez (2007) <sup>(22)</sup> en su tesis Doctoral “Efecto antitumoral, anti VIH y elucidación estructural de las hojas y corteza de *Calophyllum brasiliense* de Satipo y Pucallpa”, en cuanto al bioensayo de toxicidad en *Artemia salina* donde la  $CL_{50}$  fue de 70,5 ug/ml, lo cual indica que ambas especies tienen actividad tóxica y se consideran bioactivas.

### 4.3. CONCLUSIONES

En la evaluación citotóxica a diferentes concentraciones, se observó actividad sobre los nauplios de *Artemia franciscana*, siendo el efecto del extracto hidroalcohólico de fruto inmaduro de mayor actividad en relación con el de las hojas de *Inga edulis* Mart.

Del análisis Probit, se obtuvo un  $CL_{50}=0,05724$  ppm para fruto inmaduro y  $CL_{50}= 9,20662$  ppm para hojas de *Inga edulis* Mart., resultado que evidencia diferencia en la especie vegetal; es decir el fruto inmaduro produce mayor actividad citotóxica en comparación a las hojas.

Los valores de  $CL_{50}$  de fruto inmaduro y hojas de *Inga edulis* Mart., se puede concluir que el fruto inmaduro presenta menor  $CL_{50}$  en comparación a las hojas, identificándose así como el de mejor actividad citotóxica *in vitro*.

#### 4.4. RECOMENDACIONES

Llevar a cabo estudios químicos para la identificación de compuestos activos: espectrofotometría de masa, ultravioleta visible (UV-Vis), infrarrojo (IR), cromatografía de columna; tanto a las hojas y fruto inmaduro de *Inga edulis* Mart.

Asimismo, desarrollar estudios de toxicidad crónica por administración continua a (90 días) para determinar efectos tóxicos acumulativos o efectos carcinogénicos.

La prueba de *Artemia spp.* es útil para la evaluación de extractos de plantas con el fin de predecir su toxicidad. Sin embargo, aunque el método ofrece ventajas tales como rapidez, simplicidad y bajo costo, debe estar sujeto a una validación entre otras pruebas, tales como toxicidad oral a 60 o 90 días.

#### 4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cañas, A., Ramírez, J., Valle, A. (2003). Determinación de la bioactividad citotóxica *in vitro* de extractos de veinticinco especies vegetales mediante el ensayo con *Artemia salina*. Universidad de el Salvador. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/5668/>
2. McLaughlin JL, Lingling LR, Anderson JE. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information J.* 1998;32:513-524. Disponible en: <http://www.pawpawresearch.com/brineshrimp1.pdf>
3. Fatope M. Phytocompounds: Their bioassay and diversity. *Discov Innov.* 1995;7(3):229-235.
4. Fatope M, Ibrahim H, Takeda Y. Screening of higher plants reputed as pesticides using Brine shrimp Lethality Assay. *Int J Pharmacog.* 1993;4:250-254.
5. Jhon Henry Galvis García, Diana Marcela Ocampo, Rogelio Ocampo, Paul David A. Gutiérrez-Cárdenas (2012). Actividad tóxica de los extractos de la corteza de tallo de *Annona cherimolioides* (annonaceae) sobre *Artemia salina*. ISSN 0123 - 3068 bol.cient.mus.hist.nat. 16 (2): 17 - 22
6. Medina C., Lopez A., Maeda A. Mejoramiento del desarrollo larval de *Artemia franciscana* por un consorcio bacteriano. Centro de Investigaciones Biológicas del Nor Oeste, S.C. México. 2012; 1
7. Determinación de la toxicidad aguda (CL<sub>50</sub>) del extracto de polvillo de carbón frente a larvas de *Artemia franciscana*. [Tesis de grado para optar el título de Magister en Toxicología]. Cartagena: Universidad Nacional de Colombia (2011). Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/4320/1/598923.2011.pdf> Fecha de acceso: 29 Julio 2017

8. Martínez M., Ocampo D., Galvis J., Valencia A. Actividad antibacteriana y citotoxicidad in vivo de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). Revista Cubana de plantas medicinales. Universidad de Caldas. Colombia (2011). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962011000400002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962011000400002) Fecha de acceso: 24 de Marzo 2017
9. Cavada B., Do Nascimento K., Dos Santos A., Goulart A. Da Rocha B. Toxicity of Some Glucose/Mannose-Binding Lectins to *Biomphalaria Glabrata* and *Artemia franciscana*. Bioreso. Tech.,(2010) 101: 794–798.
10. *Inga edulis* Mart.. Taxonomy Browser. Disponible en: [www.tropicos.org/Taxonomybrowser.aspx?nameid=13006228&projectid=0&conceptid=1](http://www.tropicos.org/Taxonomybrowser.aspx?nameid=13006228&projectid=0&conceptid=1) Fecha de acceso: 24 de Marzo 2017
11. Guaba, ingá o pacaé (*Inga edulis* Mart.): ficha y características. Disponible en: <http://archivo.infojardin.com/tema/guaba-inga-o-pacaé-inga-edulis-ficha-y-características.167193/> Fecha de acceso: 24 de Marzo 2017
12. Brito R, Gelabert R. & Jimenez, J. Efectos tóxicos del Níquel y el Zinc en *Artemia franciscana* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca). Universidad y ciencia, 22. 001: 65-74 (2006). Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Rolando\\_Gelabert/publication/28123612\\_Efectos\\_toxicos\\_del\\_niquel\\_y\\_el\\_zinc\\_en\\_artemia\\_franciscana\\_crustacea\\_branchiopoda\\_anostraca/links/0912f50be083b60f57000000/Efectos-toxicos-del-niquel-y-el-zinc-en-artemia-franciscana-crustacea-branchiopoda-anostraca.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Rolando_Gelabert/publication/28123612_Efectos_toxicos_del_niquel_y_el_zinc_en_artemia_franciscana_crustacea_branchiopoda_anostraca/links/0912f50be083b60f57000000/Efectos-toxicos-del-niquel-y-el-zinc-en-artemia-franciscana-crustacea-branchiopoda-anostraca.pdf) Fecha de acceso: 20 de Abril 2017
13. Amons R., Clegg J., Liang P. y Macrae T. Molecular characterization of a small heat shock/alpha-crystallin protein in encysted *Artemia* embryos. J Biol Chem. (1997) 272:19051-19058.
14. Liang P. y Macrae T. The synthesis of a small heat shock/alphacrystallin protein in *Artemia* and its relationship to stress tolerance during development. DevBiol, (1999) 207:445-56. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10068475> Fecha de acceso: 30 de Abril 2017.

15. Andriolli A., Beraldo H., Santos D., Teixeira S., Teixeira L. y Ziolli R. Avaliação do potencial citotóxico de 2-piridiniformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de Fe (III) utilizando *Artemia franciscana*. *Heal. and Environ. J.* (2007) 8: 2-10. Disponible en: [http://www.puc-rio.br/pibic/relatorio\\_resumo2007/resumos/QUI/ana\\_claudia\\_andriolli\\_danielle\\_da\\_s\\_santos\\_silvio\\_cesar\\_godinho\\_teixeira.pdf](http://www.puc-rio.br/pibic/relatorio_resumo2007/resumos/QUI/ana_claudia_andriolli_danielle_da_s_santos_silvio_cesar_godinho_teixeira.pdf)
16. Bartolomé M. y Sánchez S. Valoración del riesgo toxicológico sobre larvas de *Artemia* de desinfectantes utilizados en torres de refrigeración, Editorial: Universidad Complutense de Madrid, España. Página 203 (2008).
17. Sorgeloos P. The culture and use of brine shrimp *Artemia salina* as food for hatchery raised larval prawns, shrimp and fish in Southeast Asia. *FAO Report* THA/75/008/78/WP3, 50 p. (1978). Disponible en: <http://www.fao.org/3/contents/52f6a415-9eeb-5a71-94bc-2f8430b4b7c8/AB906E00.htm> Fecha de acceso: 20 de Abril 2017
18. Bussmann RW, Malca G, Glenn A, Sharon D, Nilsen B, Parris B, Dubose D, Ruiz D, Saleda J, Martinez M, Carillo L, Walker K, Kuhlman A, Townesmith A. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *J Ethnopharmacol.* 2011 Sep 1;137(1):121-40. doi: 10.1016/j.jep.2011.04.071. Epub 2011 May 6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21575699> Fecha de acceso: 20 Julio 2017.
19. De la Torre A., Figueroa J., Martínez L. (2001). El código de ética en la experimentación animal no puede ser letra muerta. Centro para el control estatal de la calidad de los medicamentos. *Anuario Toxicología* 1(1):140-5.

20. Meyer, B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., Mc Laughlin J.L.: Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta médica*. 45:31-4, 1982.
21. Huamán, S; Hurtado, H; Kong, V; León, C; León, D; Lister, P; Miñano, Karla; Orrego, F; Santillán, L; Sánchez, M; Vargas, E; Castañeda, Benjamín; Ibañez, Lucy. Estudio toxicológico y teratogénico del extracto metanólico de *Cinnamomun zeylanicum* (canela) (2003). Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILAC S&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=677693&indexSearch=ID> Fecha de acceso: 24 setiembre 2018
22. Efecto antitumoral, anti VIH y elucidación estructural de las hojas y corteza de *Calophyllum brasiliense* de Satipo y Pucallpa. [Tesis doctoral]. Lima: Universidad San Martín de Porres (2007). Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/3716/371637116001.pdf> Fecha de acceso: 24 Setiembre 2018



## 4.6. ANEXOS

### Anexo 1

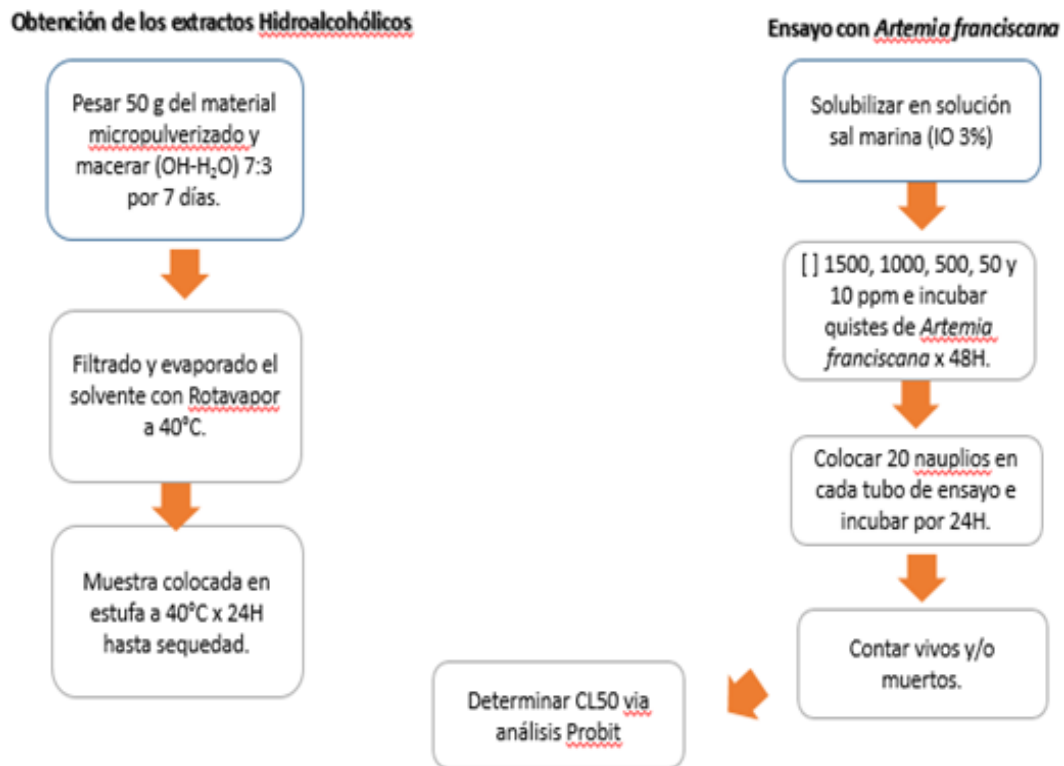


Figura 1. Flujograma del ensayo de la actividad citotóxica

## Anexo 2

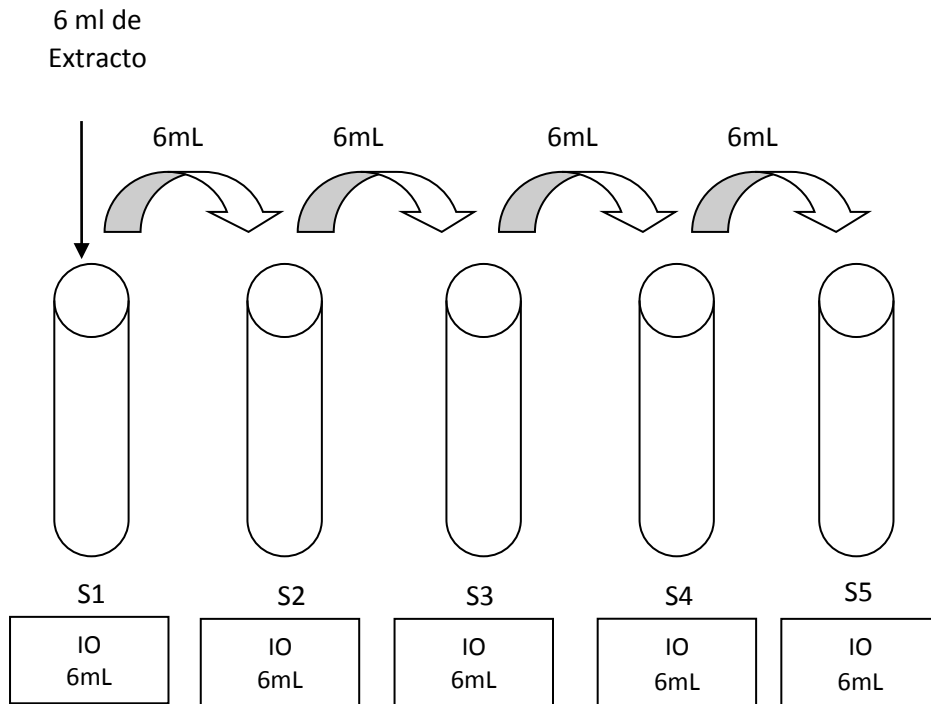


Figura 2. Esquema de dilución del extracto para el experimento de citotoxicidad

## Anexo 3

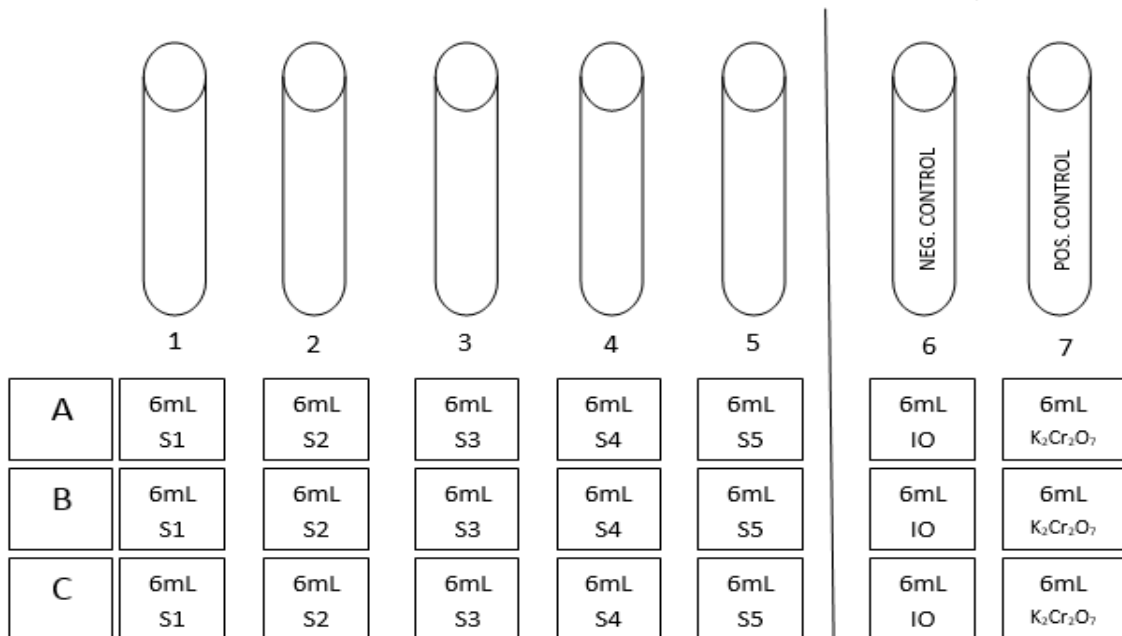


Figura 3. Configuración de esquema de experimento de citotoxicidad

## Anexo 4

### AREA DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA

#### HOJA DE TRABAJO ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA POR *Artemia franciscana*

#### REGISTRO DE DATOS Y RESULTADOS

FECHA:  
H. INICIO:  
H. TERMINO:

#### CANTIDAD DE LARVAS INYECTADAS

Muestra	Extracto de:					Control (-)		Control (+)		
[c]	S1	S2	S3	S4	S5	S7	S8			
repeticiones:	1500	1000	500	50	10	Sol. IO 3%		400 ppm K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>		
1ª réplica A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7			
2ª réplica B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7			
3ª réplica C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7			

#### CONTEO DE LARVAS VIVAS Y MUERTAS DE *Artemia franciscana* EN LAS DISOLUCIONES

FECHA:

Muestra	[c] ug/ml	Repeticiones	LARVAS DE <i>Artemia</i>			
			Total	Vivas	Muertas	% Letal
..... ..... ..... (Sol. IO 3%)	S1 1500 ppm	1ª repeticiónA1 2ª repeticiónB1 3ª repeticiónC1  Total				
..... ..... ..... (Sol. IO 3%)	S2 1000 ppm	1ª repeticiónA2 2ª repeticiónB2 3ª repeticiónC2  Total				
..... ..... ..... (Sol. IO 3%)	S3 500 ppm	1ª repeticiónA3 2ª repeticiónB3 3ª repeticiónC3  Total				
..... ..... ..... (Sol. IO 3%)	S4 50 ppm	1ª repeticiónA4 2ª repeticiónB4 3ª repeticiónC4  Total				
..... ..... ..... (Sol. IO 3%)	S5 10 ppm	1ª repeticiónA5 2ª repeticiónB5 3ª repeticiónC5  Total				

Registro 1: Hoja de trabajo\_ ensayo de toxicidad por *Artemia franciscana*

## Anexo 5

### CONTEO DE LARVAS VIVAS Y MUERTAS DE *Artemia franciscana* DEL CONTROL (-) Y (+)

Muestra	[c] ug/ml	Repeticiones	LARVAS DE ARTEMIA			
			Total	Vivas	Muertas	%Letal
Solución IO 3% (Control negativo)	S7	1ª Repetición A7				
		2ª Repetición B7				
		3ª Repetición C7				
		Total				
Solución K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (Control positivo)	S8 400	1ª Repetición A8				
		2ª Repetición B8				
		3ª Repetición C8				
		Total				

### RESULTADOS Y CÁLCULO DE LA CL<sub>50</sub> DE LA MUESTRA FRENTE A LAS LARVAS DE *Artemia*

Muestra	[c] ug/ml	Repeticiones	LARVAS DE ARTEMIA				CL <sub>50</sub>
			Total	Vivas	Muertas	%Letal	ug/ml
(En Sol. IO 3%)	1500 ppm	total					
	1000 ppm	total					
	500 ppm	total					
	50 ppm	total					
	10 ppm	total					

Con los resultados se grafica [c] vs [% larvas vivas] y se obtiene una línea recta y se aplica la ecuación  $y=mx+b$ , se determina la pendiente (m) y el intercepto (b) y con estos datos se aplica a  $Y=50\%$  para obtener la concentración.

\* Clasificación Toxicidad según CYTED

### RESULTADOS DEL CONTROL (-) Y (+) FRENTE A LAS LARVAS DE *Artemia*

Muestra	[c] ug/ml	Repeticiones	LARVAS DE ARTEMIA				CL <sub>50</sub>
			Total	Vivas	Muertas	%Letal	ug/ml
Sol. IO 3%		total					
Solución K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	400 ppm	total					

\*\* Según referencias

### TABLA DE CLASIFICACIÓN DE TOXICIDAD SEGUN CYTED

GRUPO	CATEGORIA	ESCALA (ug/ml)
I	Extremadamente tóxico	1 - 10
II	Altamente tóxico	10 - 100
III	Moderadamente tóxico	100 - 500
IV	Ligeramente tóxico	500 - 1000
V	Prácticamente no tóxico	1000 - 1500
VI	Relativamente inócuo	>1500

Registro 2: Hoja de trabajo\_ conteo de larvas vivas / muertas de *Artemia franciscana*

## Anexo 6

### Registro 3: Constancia de certificación de la especie vegetal



# UNAP

**Herbarium Amazonense – AMAZ**  
**Centro de Investigación**  
**de Recursos Naturales**

### CONSTANCIA Nº 012-2017-AMAZ-UNAP

El Coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del CIRNA, de La Universidad Nacional De La Amazonia Peruana

**HACE CONSTAR:**

Que, la muestra botánica presentada por los bachilleres: **EDWARD JOAO SINTI OCHAVANO** y **IORELLA DELFINA TORRES ROJAS**, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; es parte de la tesis titulada: “**CITOTOXICIDAD IN VITRO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE HOJAS Y DEL FRUTO INMADURO DE *Inga edulis* SOBRE ARTEMIA FRANCISCANA, IQUITOS - PERÚ**”, la cual fue verificada y determinada en este Herbarium Amazonense-AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indica:

Cod. Herbarium	Familia	Nombre científico	Nombre común
027714	FABACEAE	<i>Inga edulis</i> Mart.	"guaba"

Se expide la presente constancia a los interesados para los fines que se estime conveniente.

Iquitos 17 de Abril del 2017

Atentamente,

  
  
**Bigo. RICHARD HUARANCA ACOSTUPA M.Sc.**  
**Coordinador del Herbarium AMAZ**  
**CIRNA-UNAP**

---

Dirección Pevas/Nanay – Iquitos Perú  
Apdo. 496Página 1 de 1Centro de Investigaciones de Recursos Naturales