



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

Tesis

“Citotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcoholico de corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq sobre *Artemia franciscana*”

Para optar el título de

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Autores

Bach. ASPAJO JULCA, Erick Lucio

Bach. SIGUAS CISNEROS, Lesman

Asesores:

Q.F MARIO JAVIER DE LA CRUZ FLORES, Mgr.

ING. DORA ENITH GARCÍA DE SOTERO, Dra.

Iquitos – Perú

2019

ACTA DE SUSTENTACIÓN

En el caserío de Nina Rumi, Distrito de San Juan Bautista, Departamento de Loreto, a los 27 días del mes de Julio del dos mil diecinueve, siendo las 11:00 Horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designado según Resolución Decanal N°133-FFB-UNAP-2018, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- | | |
|---|------------|
| ➤ Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Dra. | Presidenta |
| ➤ Q.F. LUIS DOMINGO NONATO RAMÍREZ, Dr. | Miembro |
| ➤ Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG, | Miembro |



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 Tesis Titulada **"CITOTOXICIDAD In Vitro DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE CORTEZA DE *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq SOBRE *Artemia franciscana*"**, presentado por los Bachilleres ERICK LUCIO ASPAJO JULCA Y LESMAN SIGUAS CISNEROS, 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:

..... Adecuadamente

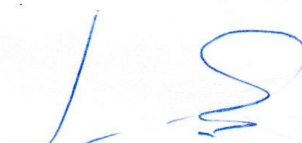
Los miembros del Jurado Calificador llegaron a las siguientes conclusiones:


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



Siendo las 12:20 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándoles a los sustentantes por su Exposición


Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Dra.
PRESIDENTA


Q.F. LUIS DOMINGO NONATO RAMÍREZ, Dr.
MIEMBRO


Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG
MIEMBRO

Carretera Zungarococha – Nina Rumi
Correo electrónico: farmacia
San Juan – Loreto – Perú.
Celular N°942917936
www.unapiquitos.edu.perú

UNIVERSIDAD
LICENCIADA
RESOLUCIÓN N°012-2019-SUNEDU-UNAP

Lima, 1 de febrero de 2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

*"Citotoxicidad in vitro del extracto hidroalcoholico de corteza de Maytenus
macrocarpa (Ruiz & Pav.) Briq sobre Artemia franciscana"*

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE :



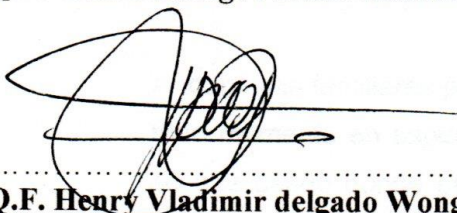
.....
Q.F. Frida Enriqueta Sosa Amay, Dra.

PRIMER MIEMBRO:



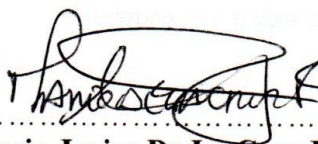
.....
Q.F. Luis Domingo Nonato Ramirez, Dr.

SEGUNDO MIEMBRO:

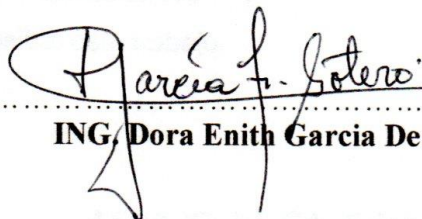


.....
Q.F. Henry Vladimir delgado Wong.

ASESORES :



.....
Q.F. Mario Javier De La Cruz Flores, Mgr.



.....
ING. Dora Enith Garcia De Sotero, Dra

DEDICATORIA

Al creador de todas las cosas, el que me ha dado fortaleza para continuar cuando estaba a punto de caer, por ello con toda la humildad que de mi corazón pueda emanar dedico esta tesis primeramente a Dios.

De igual manera dedico esta tesis a mis padres, en especial a mi madrecita bella Carmen que ha estado conmigo en los buenos y malos momentos muy difíciles, gracias por todas las enseñanzas y por todo lo aprendido.

A mis hermanos y tíos en especial a Gean, Manuel y Wilder, porque ellos fueron mi fortaleza para salir adelante, y siempre estuvieron conmigo dándome consejos para ser un profesional de bien.

A todos mis familiares por estar conmigo en todo momento en especial a mi mama luz, sé que desde donde estés siempre vivirás eternamente en mi corazón y desde el cielo siempre me estas cuidando y guiando.

A todos mis amigos en especial a mi compañero de tesis Lesman, porque gracias a nuestras capacidades y habilidades hacemos posible este trabajo.

ASPAJO JULCA, Erick Lucio

DEDICATORIA

A DIOS Todopoderoso, por darme la vida, salud, que ha estado con nosotros en todo momento, el que nos ha dotado de sabiduría, el que nos ha dado la fuerza para continuar.

A los seres que más amo en este mundo: mis padres LESLY Y MANOLO, los seres más sublimes que me ha dado Dios, que con su sencillez y humildad supieron ser los verdaderos forjadores de mi superación y los que alimentaron mi vocación al servicio de los demás.

A mis hermanos, las cuales me motivaron siempre a seguir adelante y a no descansar en los sueños, gracias por mantener en mí viva la esperanza este triunfo también es de ustedes.

A todos mis familiares por estar conmigo en todo momento en especial a mis abuelitos por los consejos y el cariño, a un ser querido que no está presente conmigo pero siempre lo llevo en mi corazón.

A mi compañero de tesis y a todos los que estuvieron presentes en cada una de las diferentes etapas de mi vida, y que no los menciono pues sería muy extensa la lista, más sin embargo gracias a todos ustedes, me convierto en la consecuencia de aquella confianza que fue depositada en mí, gracias por creer en mí.

SIGUAS CISNEROS, Lesman

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 nuestros asesores de tesis Dra. Dora Enith García de Sotero y Q.F. Mario Javier De la Cruz Flores, por habernos brindado la oportunidad de recurrir a sus capacidades y conocimiento científico, así como también habernos tenido la paciencia del mundo para guiarnos durante todo el desarrollo de la tesis.

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.

ASPAJO JULCA, ERICK LUCIO
SIGUAS CISNEROS, LESMAN

“Citotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de corteza de *Maytenus macrocarpa*
(Ruiz & Pav.) Briq sobre *Artemia franciscana*”

ASPAJO JULCA, Erick Lucio y SIGUAS CISNEROS, Lesman

RESUMEN

En el presente estudio, se determinó la actividad citotóxica *in vitro* de corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq sobre *Artemia franciscana* y los metabolitos secundarios; la misma que fue procedente de la reserva comunal Tamshiyacu del Distrito Fernando Lores Tenazoa - Región Loreto. La muestra fue seleccionada, limpiada y secada. El secado se realizó en un equipo deshumecedor en ambiente con temperatura constante de 35 °C por seis días, posteriormente fueron micropulverizadas. Las muestras micropulverizadas fueron tratadas con etanol – agua, obteniéndose así un extracto hidroalcohólico. Para la actividad citotóxica, se evaluaron concentraciones de 1500 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 50 ppm y 10 ppm del extracto hidroalcohólico.

La determinación de la actividad citotóxica fue a través del cálculo CL_{50} vía análisis Probit, obteniéndose un Cl_{50} de 5,2867ppm y metabolitos secundarios: antocianinas 67,25 mg; flavonoides 91,62 mg; fenólicos 5794,62 mg; en catequinas y proantocianidinas 0,00278 mg por 100g de la especie estudiada; alcaloides totales 20,32 mg y saponinas 1227,08 mg/100g respectivamente.

Se concluyó que la corteza con $Cl_{50}=5,2857$ ppm produce actividad biológica de citotoxicidad siendo altamente tóxica; y, la presencia de metabolitos secundarios: alcaloides, fenólicos y saponinas, puede ser la causa de la actividad citotóxica en la especie vegetal estudiada.

Palabras Claves: *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.). Actividad citotóxica, *Artemia franciscana*, metabolitos secundarios

“In vitro cytotoxicity from the hydro – alcoholic extract of the imadure leaves and fruit of the species *Inga edulis Mart.* on *Artemia franciscana*”

ASPAJO JULCA, Erick Lucio y SIGUAS CISNEROS, Lesman

ABSTRACT

In the present investigation, the *in vitro* cytotoxic activity of *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq on the *Artemia franciscana* and the secondary metabolites was determined; the same one that came from The communal reserve Tamshiyacu in Fernando Lores Tenazoa District - Loreto Region. The sample was selected, cleaned and dried. The drying was carried out in a dehumidifying equipment in a constant temperature environment of 35 ° C during six days, later on were pulverized. The micropulverized samples were treated with ethanol - water, obtaining a hydroalcoholic extract. For the cytotoxic activity, concentrations of 1500 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 50 ppm and 10 ppm of hydroalcoholic extract were evaluated.

The determination of the cytotoxic activity was through LC50 calculation via Probit analysis, obtaining a CL50 of 5,2867ppm and secondary metabolites: anthocyanins 67,25 mg; flavonoids 91,62 mg; phenolic 5794,62 mg; in catechins and proanthocyanidins 0,00278 mg per 100g of the species investigated; total alkaloids 20,32 mg and saponins 1227,08 mg / 100g respectively.

It was concluded that the bark with CL50 = 5,2857 ppm produces biological activity of cytotoxicity being highly toxic; and also presence of secondary metabolites: alkaloids, phenolics and saponins, may be the cause of the cytotoxic activity in the investigated plant species.

Key Words: *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.). Cytotoxic activity, *Artemia franciscana*, secondary metabolites

INDICE DEL CONTENIDO

Contenido	Pág.
Dedicatoria	iv
Agradecimiento	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
Indice	ix
Indice tablas	xi
Indice graficos	xii
Indice figuras	xiii
Lista de anexos	xiv
Siglas y abreviaturas	xv
CAPITULO I	16
1.1. Introducción	17
1.2. Objetivos	19
1.2.1. Objetivo General	19
1.2.2. Objetivos Específicos	19
CAPITULO II	20
Marco Teórico	21
2.1. Antecedentes	21
2.2. Marco conceptual	23
2.2.1. <i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq	23
2.2.1.1. Clasificación taxonómica	23
2.2.1.2. Distribución	23
2.2.1.3. Sinonimias	23
2.2.1.4. Nombres comunes	23
2.2.1.5. Hábitat	23
2.2.1.6. Descripción botánica	24
2.2.1.7. Etnofarmacología y forma de empleo	26
2.2.1.8. Características climáticas	27
2.2.1.9. Biotopo de poblaciones naturales	27
2.2.2. <i>Artemia franciscana</i>	28

2.2.3. Metabolitos secundarios	31
2.3. Hipótesis	34
2.4. Variables	35
2.4.1. Variable dependiente	35
2.4.2. Variable independiente	35
2.5. Operacionalización de variables	36
CAPITULO III	38
Metodología	39
3.1. Tipo de estudio	39
3.2. Diseño de la Investigación	39
3.3. Población y Muestra	39
3.4. Procedimiento experimental	40
3.4.1. Preparación de los extractos hidro-alcohólicos	40
3.4.2. Ensayo de citotoxicidad	40
3.4.2.1. Preparación de la muestra	40
3.4.2.1.1. Certificación de la especie vegetal	40
3.4.2.1.2. Animales de experimentación	40
3.4.3. Metabolitos secundarios	42
3.5. Materiales, Equipos y Reactivos	45
3.5.1. Materiales	45
3.5.2. Equipos	46
3.5.3. Reactivos, insumos y drogas	46
3.6. Instrumento de recolección de datos	46
3.7. Procesamiento de la información	46
3.8. Consideraciones Éticas	46
CAPITULO IV	48
4.1. Resultados	49
4.1.1. Actividad citotóxica	49
4.1.2. Metabolitos secundarios	51
4.2. Discusión	53
4.3. Conclusiones	54
4.4. Recomendaciones	55
4.5. Referencias bibliográficas	56
4.6. Anexos	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Cantidad de nauplios inyectados	49
Tabla 2.	Conteo de nauplios vivos y muertos de <i>Artemia franciscana</i> en las disoluciones	49
Tabla 3.	Cálculo de la CL ₅₀ a partir de la ecuación lineal: $y = -0.2372 + 3.9855x$, obtenida vía análisis Probit	51
Tabla 4.	Determinación de fenólicos totales	51
Tabla 5.	Determinación de Alcaloides totales	51
Tabla 6.	Determinación de Saponinas	52

ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1.	Análisis probit – corteza de <i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq	50
------------	---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Corteza de <i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq	24
Figura 2: Hojas de <i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq	25
Figura 3: Flores de <i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq	25
Figura 4: Huevos	29
Figura 5: Rotura de la membrana	29
Figura 6: Estadío de gota (membrana de eclosión unida al corión)	29
Figura 7: Nauplio	29
Figura 8: Metanauplio (24H)	29
Figura 9: Metanauplio (48H)	29
Figura 10: Curva de calibración de fenoles totales	43
Figura 11: Curva de calibración de alcaloides	44

LISTA DE ANEXOS

Figura 12.	Flujograma del ensayo de la actividad citotóxica	62
Figura 13.	Esquema de dilución del extracto para el experimento de citotoxicidad	63
Figura 14.	Configuración de esquema de experimento de citotoxicidad	63
Registro 1.	Hoja de trabajo ensayo de toxicidad por <i>Artemia franciscana</i>	64
Registro 2.	Hoja de trabajo conteo de larvas vivas / muertas de <i>Artemia franciscana</i> .	65
Registro 3.	Constancia de certificación de la especie vegetal	66

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ppm= partes por millón

FFB= Facultad de Farmacia y Bioquímica

CL₅₀= Concentración letal media 50

IO= Instan Ocean

OMS= Organización mundial de la Salud

M.macrocarpa= *Maytenus macrocarpa*

INIA= Instituto Nacional de Innovación Agraria

H₀= Hipótesis nula

H₁= Hipótesis del investigador

K₂Cr₂O₇= Dicromato de potasio

DMSO=Dimetil Sulfóxido

ups=unidades prácticas de salinidad

CAPITULO I

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCION

El descubrimiento de nuevas sustancias a partir de plantas con actividad terapéutica constituye una de las alternativas de origen natural para combatir una serie de enfermedades como el cáncer, ya que se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 en las próximas dos décadas ⁽¹⁾.

La naturaleza ha demostrado ser una fuente importante de compuestos anticancerígenos efectivos; por ejemplo, drogas derivadas de microorganismos y de plantas ⁽²⁾.

El estudio de propiedades curativas de plantas peruanas es hasta el momento incipiente, siendo mínimo el de las especies con posible actividad antineoplásica. Las plantas superiores han sido una fuente útil de compuestos antitumorales de importancia clínica, por eso es importante estudiar los productos de origen natural mediante modelos *in vitro* y/o *in vivo*, en donde destaca los ensayos de citotoxicidad como uno de los indicadores de actividad antitumoral inicial ⁽³⁾.

En ese sentido, las pruebas *in vitro* representan una etapa importante al estudio farmacológico de nuevos medicamentos previa a las pruebas *in vivo*; ya que estas pruebas son relativamente más económicas, se pueden efectuar en un periodo más corto de tiempo y son altamente sensibles ⁽⁴⁾.

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 ⁽⁴⁾.

Un lugar sobresaliente dentro del grupo de bioensayos más utilizados lo ocupa el de *Artemia spp.*, en donde se utilizan organismos vivos para detectar o medir la presencia y efectos de una o más sustancias tóxicas, así como determinar el límite de tolerancia de éstos a dichas sustancias ^(5,6,7).

Todas las sustancias con efectos tóxicos, por variados que éstas sean, son compuestos químicos complejos que provocan enfermedades o en otros casos ocasionan la muerte según la dosis ingerida. Entre las sustancias tóxicas que contienen muchas plantas se encuentran alcaloides, glicósidos cardiotónicos, saponinas y terpenoides ⁽⁸⁾.

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 (CL₅₀) 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 ⁽⁸⁾.

En la región amazónica del Perú, es común el uso de las plantas medicinales, entre estas destaca la especie *Maytenus macrocarpa* o “chuchuhuasi”, donde el uso tradicional es conservado en las comunidades nativas y también en los habitantes de zonas urbanas ^(9,10).

La mayoría de preparados a base de *Maytenus macrocarpa* existentes en el mercado local (como: tonificante, revitalizante, energética, antiartrítica, antidisentérica, antihemorroidal, antitumoral, antitusígena, afrodisíaca, entre otras más), son fabricados sin estudios previos de toxicidad; por lo que con este trabajo de investigación se pretende identificar una alternativa etnomedicinal confiable ⁽¹⁰⁾.

Es por ello que el presente trabajo de investigación, planteó como objetivo determinar la actividad citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq sobre *Artemia franciscana*; así como determinar los metabolitos secundarios presentes en la corteza.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

- Determinar la actividad citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq sobre *Artemia franciscana*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar la actividad citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq sobre *Artemia franciscana* a diferentes concentraciones 10, 50, 500, 1000 y 1500 ppm.
- b) Determinar la concentración letal media (CL₅₀) del extracto hidroalcohólico de corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq sobre *Artemia franciscana*, vía análisis Probit.
- c) Determinar los metabolitos secundarios presentes en la corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq.

CAPITULO II

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1. ANTECEDENTES

Apaclla, R. et al (2015), evaluaron el contenido de metales (hierro, manganeso, cobre, zinc, magnesio, plomo cadmio y cromo) presentes en la raíz, corteza y hojas de *Maytenus macrocarpa* (chuchuhuasi) de uso etnomedicinal en la Región Loreto. El estudio fue de tipo descriptivo, tuvo como población a los individuos de *Maytenus macrocarpa* (chuchuhuasi) que crecen en ambos lados de la carretera Iquitos-Nauta desde el kilómetro 17 al kilómetro 50 y las muestras fueron los individuos recolectados de los transeptos usados por los materos, esto con el fin de no depredar el bosque. Utilizaron como técnica Absorción Atómica en un equipo SpectrAAVarian AA 240, con Gas de arrastre: Aire/Acetileno, señal lámpara de cátodo hueco, la detección es diferente para cada elemento. Temperatura de ionización 3000°C, inyección aspiración directa, horno de incineración (Mufla). Las concentraciones de los metales pesados analizados fueron el cadmio 0,132 ppm quien superó los límites máximos permisibles y el plomo 0,398 ppm. Concluyeron que las concentraciones encontradas de los oligoelementos analizados en corteza fueron: hierro 38,150 ppm, manganeso 3,350 ppm, cobre 4,790 ppm, zinc 13,300 ppm y cromo 4,583 ppm ⁽¹¹⁾.

León, A. et al (2014), evaluaron la actividad analgésica central de las hojas de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. (chuchuhuasi) en ratones, mediante el modelo de retirada de la cola. La metodología fue aplicada a 50 ratones albinos (25 g promedio), divididos en 5 grupos, en donde se les administró por vía oral *M. macrocarpa* 1000 y 1500 mg/kg, Tramadol 10 mg/kg, agua destilada (placebo) 0,1mL /10 g, y un grupo control. La técnica utilizada fue la evaluación del dolor en el roedor, midiendo el promedio del período de latencia, después de 6 mediciones de intervalos de 30 minutos; determinando así el porcentaje del efecto máximo posible (% MPE, por sus siglas en inglés). Obtuvieron como resultados: chuchuhuasi 1000mg/kg a los 30 minutos, frente al control presentó un valor $p < 0,05$. El grupo placebo no fue significativo. El % MPE fue de 19%

para chuchuhuasi 1000 mg/kg, 14% para chuchuhuasi 1500 mg/kg y 37% para tramadol. Concluyeron que el efecto analgésico central de las hojas de *M. macrocarpa* en el modelo de retirada de la cola no fue significativo, el máximo % MPE fue de 19 %, con chuchuhuasi a 1000 mg/kg ⁽¹²⁾.

Alosilla A. et al (2013), determinaron el efecto del extracto etanólico de hojas de *Maytenus macrocarpa* sobre la motilidad intestinal en ratones a dosis de 0.1mL/10g como marcador intestinal, utilizaron el método Arbos, donde obtuvieron el porcentaje de recorrido intestinal de carbón activado de 43.28%, 33.03%, 74.37%, 67.52% y 63.09% respectivamente. Concluyeron que el extracto etanólico de las hojas de *Maytenus macrocarpa* presenta actividad estimulante de la motilidad intestinal del roedor ⁽¹³⁾.

Medina C. et al. (2012), evaluaron el efecto de bacterias asociadas a quistes comerciales en la sobrevivencia y desarrollo de larvas de *Artemia franciscana* en reto con cepas bacterianas a 6 días de cultivo, cepas de *Microbacterium* (cepas 8L, 8R), *Exiguobacterium* (cepa 8N) y *Vibrio parahaemolyticus* 588 (de la CECT) utilizando como levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) estéril como alimento ⁽¹⁴⁾.

Pacheco J. (2011), determinó la toxicidad aguda (CL₅₀) 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), utilizando como blanco dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración de 20 mg/L. Los resultados fueron procesados con el método Probit, obteniéndose valores de CL₅₀ de 8.89 mg/L y 4.20 mg/L tras exposiciones de 24 y 48 horas respectivamente ⁽¹⁵⁾.

2.2. MARCO CONCEPTUAL

2.2.1 *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq

2.2.1.1 Clasificación taxonómica ⁽¹⁶⁾

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Celastrales
Familia	:	Celastraceae
Género	:	Maytenus
Especie	:	<i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq

2.2.1.2 Distribución

Se distribuye en la región subandina de la hoya del Amazonas en Colombia, Ecuador y Perú. En la frontera colombo – ecuatoriana se distribuye en alturas entre 300 y 400 m.s.n.m.⁽¹⁶⁾.

2.2.1.3 Sinonimias

Maytenus macrocarpa, *Maytenus ebenifolia*, *Maytenus terapotensis*, *Maytenus Multiflora* (R.&P.) Loesener, *Celastrus macrocarpus* R.&P., *Haenkea macrocarpa* (R&P) Steudel.

2.2.1.4 Nombres comunes

Chuchuhuasi, Chuchuhuasha, Chuchuguaza, Chuchuhuasca

2.2.1.5 Hábitat

La familia de las Celastráceas comprende alrededor de 800 especies, en tanto el género *Maytenus* está representado por 200 especies distribuidas en ambos hemisferios. Florece desde mediados de agosto hasta mediados de febrero; fructifica desde finales de septiembre hasta finales de marzo; presenta buena capacidad de rebrote; la regeneración natural es infrecuente en bosque primario y en bosque intervenido ⁽¹⁷⁾.

2.2.1.6 Descripción botánica

Se trata de un árbol perteneciente a la familia de las Celastráceas, caracterizado por presentar una altura entre 12-25 metros; tronco de 60 cm de diámetro con corteza de color rojizo y bien ramificado en su parte media superior. Fuste irregular. Copa abierta, ramificación densa, decurrente. Corteza (0.3-0.5 cm) externa café oscura; corteza interna crema. Madera muy dura pero “lechosa” ⁽¹⁸⁾.



Figura 1: Corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq

Fuente: Golden, Map (2005)

Hojas: persistentes, coriáceas, alternas, pecioladas, enteras; estípulas muy pequeñas, deciduas; lámina angostamente elíptica u ovado-elíptica, ápice abruptamente acuminado, simples (5-8 cm), alternas, dísticas; pecíolo (0.2 cm), glabro; lámina elíptica (5-8 cm X 3 cm), consistencia coriácea, ápice agudo, base cuneada, margen entero levemente revoluto, nervación pinnada camptódroma (6-8 pares de nervios secundarios), haz y envés glabros. Follaje verde claro vistoso con hojas persistentes ⁽¹⁹⁾.



Figura 2:

Hojas de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq

Fuente: Golden, Map (2005)

Flores: unisexuales pequeñas en inflorescencia axilar (0.5 cm), fascículo; pedicelos (0.1-0.2 cm), glabros; corola blanca, cáliz 5 lobulado, 5 pétalos, redondos en el ápice, estambres 5, insertados debajo del disco, filamentos alesnados, anteras ovaladas, ovario inmerso en el disco ⁽¹⁶⁾.



Figura 3: Flores de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq

Fuente: Flora SBS (2009)

Fruto: ovoidal, con una cápsula loculicida (1 cm), bivalvada; 1 semilla con arilo crema ⁽¹⁹⁾.

Semillas: oblongas con arilo blanco ⁽¹⁷⁾.

2.2.1.7 Etnofarmacología y forma de empleo

Raíz:

- El polvo de la raíz macerado en alcohol o aguardiente de caña se emplea como emenagogo y antirreumático.
- Por vía externa le atribuyen propiedades anticancerígenos, antiinfecciosas y antiulcerosas en piel ⁽¹⁸⁾.

Hojas:

- Las hojas de son usadas en cocimiento son antifebrífugas. Los nativos emplean las hojas para curar las erupciones cutáneas.
- Empleada en medicina popular mascando las hojas para aliviar el dolor de estómago.
- Las hojas también son utilizadas en la medicina popular de la Argentina como sialagogas, antiasmáticas y antisépticas ⁽²⁰⁾.
- En medicina popular, una infusión de 20 g de hojas en medio litro de agua, se utiliza como febrífugo y para curar erupciones cutáneas.
- Se usa para limpiar el interior del organismo después del nacimiento de un niño, tomando un té preparado a base de la planta dos veces al día durante un período de nueve días y bañándose con él por tres veces ⁽¹⁸⁾.

Corteza:

- Sirve para el reumatismo y la artritis y además sirve como reconstituyente.
- Extractos de la corteza del tronco tienen actividad antiinflamatoria y analgésica.
- Para la disentería y el dolor de garganta
- La corteza es utilizada para el tratamiento del cáncer.
- Para la bronquitis y preventivo de la caries, inmunoestimulante ⁽²¹⁾.
- Los indígenas Siona del río Putumayo en Colombia, realizan una decocción con 2 cm de la corteza en 2 litros de agua, dejando que hierva hasta que quede la mitad del volumen inicial. El resultante se toma a razón de dos tazas diarias como reconstituyente y antiartrítico ⁽²⁰⁾.
- La corteza se cocina en agua y machacada agregándole luego frutos de jojoba este líquido es aplicado en forma de gárgaras cura el dolor de garganta.

- El té preparado con la corteza del tronco o con las hojas es tomado para curar la disentería.
- La corteza de esta planta es machacada en agua y se bebe este zumo por 15 días para el tratamiento del cáncer ⁽¹⁵⁾.
- Reumatismo: la corteza en cocimiento. Se toma una copita en ayunas.
- Resfríos y bronquios: se raspan 200 g de corteza y se hierven en dos litros de agua una hora. Se cuela el líquido resultante y se coloca en una botella agregando un cuarto de litro de aguardiente. Se deja macerar durante 10 días. Tomar una cucharada en las mañanas por 15 días.
- Antidiarreico: la corteza se hierve con un poco de agua; tomar una cucharada cada tres horas.
- Hemorroides: con el cocimiento de la corteza se hacen baños de asiento.
- Afecciones de las mamas: una taza de la corteza, rallada o en trozos, se cocina en tres tazas de agua- El líquido se aplica en los pezones con grietas ⁽¹⁵⁾.

2.2.1.8 Características climáticas

- Clima: Tropical con abundante intensidad solar, temperaturas entre 22 y 27° C, precipitación pluvial entre 1000 a 3400 mm anuales.
- Suelo: Crece sea en suelos arenosos que en francos y arcillosos, pero con buen contenido de materia orgánica.

2.2.1.9 Biotopo de poblaciones naturales

Habita en áreas no inundables (suelos de altura), inundables anualmente o sólo en creciente alta, alejada o cerca de los cuerpos de agua, purmas y bosques primarios, con intensidad lumínica de intermedia a sombreada. Es resistente a la inundación. Comparte su hábitat con las siguientes especies: pona, castaña, umari, espintana, cetico, bijao, carahuasca, caña brava, amasisa, lupuna, papaya, caña de azúcar, huitó, pájaro bobo, gramalote, uvilla, charichuelo, malva, guayaba, ubos, aguaje, pijuayo, pandisho, ojé, capinuri, ayahuasca, yarina, huacapú, huamansamana, zancudo caspi, rifari, irapay, pituca.

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 ⁽²²⁾.

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 ⁽²²⁾. 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 ⁽²²⁾.

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 ⁽²³⁾.

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 ⁽²³⁾.

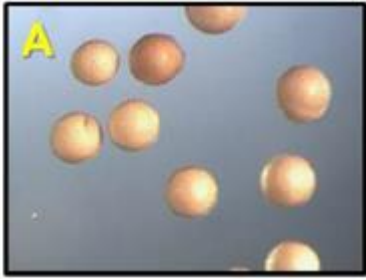


Figura 4: Huevos



Figura 5: Rotura de la membrana



Figura 6: Estadío de gota
(membrana de eclosión
unida al corión).



Figura 7: Nauplio



Figura 8: Metanauplio (24h).



Figura 9: Metanauplio (48h).

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

Fuente: Sorgeloos P (1978)

Aspectos generales para la preparación de extractos: se parte de la planta y se realiza un proceso extractivo para aislar los principios activos directamente. Entre los métodos extractivos se encuentran: extracción mecánica, destilación, extracción con fluidos en condiciones supercríticas y extracción con solventes (25).

Extracción con solventes: consiste básicamente en colocar en contacto la parte de la planta con un solvente capaz de solubilizar los principios activos. Los principios activos deben de pasar de la planta al disolvente de manera que se obtenga un extracto líquido. Posteriormente dicho extracto se puede concentrar eliminando mayor o menor cantidad de disolvente. La extracción con solventes es uno de los métodos que se emplea con más frecuencia para la obtención de principios activos. Para que la extracción con solventes se lleve a cabo correctamente hay que tener en cuenta diversos factores:

- Características de la planta: Se debe de trabajar con plantas desecadas y con un grado de división adecuado (mayor en partes duras como las cortezas y menor en partes blandas como flores y hojas) para facilitar el máximo contacto entre los principios activos y el disolvente.
- Naturaleza del solvente: Principalmente se utilizan en las extracciones el agua y las mezclas hidroalcohólicas (agua y alcohol etílico) en proporción variable. También es posible utilizar otros solventes orgánicos como acetona, éter etílico, hexano, propilenglicol, entre otros. El agua es un buen solvente de muchos principios activos de las plantas, pero por esta misma razón, resulta generalmente poco selectivo (26). Además muchos principios activos se hidrolizan en agua; por otra parte, los extractos acuosos tienen una estabilidad poco duradera una vez preparados y deben de ser obtenidos para su utilización en un periodo de tiempo relativamente corto. La utilización de mezclas variables de agua y alcohol permite seleccionar las sustancias de interés farmacológico así como separar los principios activos entre sí.
- Temperatura: El aumento de la temperatura favorece la extracción de principios activos de las plantas porque aumenta su solubilidad en los solventes utilizados, pero a su vez, puede favorecer la degradación de dichos compuestos, por lo que es necesario controlarla para obtener una

máxima extracción sin consecuencias indeseables. En ningún caso se pueden utilizar temperaturas elevadas para extraer principios activos termolábiles.

- Tiempo de contacto entre la planta y el disolvente: depende de las características de la planta (dureza, grado de división) y de la naturaleza de los principios activos (volátiles, hidrolizables, oxidables, entre otros) ⁽²⁵⁾.

2.2.3 Metabolitos secundarios

Son compuestos de bajo peso molecular, participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos. También reciben la denominación de productos naturales, porque tienen un importante y significativo valor medicinal, de uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica ⁽²⁷⁾.

En la actualidad se conocen aproximadamente 20,000 estructuras que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los Metabolitos secundarios que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no protéicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los Metabolitos secundarios no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides ⁽²⁷⁾.

Clasificación de los metabolitos secundarios:

Saponinas: son compuestos bioactivos encontrados principalmente en plantas, pero también en algunos organismos marinos e insectos. Según el carácter químico de la aglicona (conocido como sapogenina) las saponinas se dividen en esteroides y triterpenoides. Los esteroides predominan en las plantas y son compuestos que tienen 27 átomos de carbono que conforman la estructura central (spirostanol y furostanol). Por su parte las triterpenoides están compuestas principalmente por agliconas con 30 átomos de carbono (Oleanano) ⁽²⁸⁾.

Fenólicos: también llamados polifenoles, son encontrados en la mayoría de las plantas. Se clasifican en varias categorías: antocianidinas, flavonoles, flavanoles (catequinas y proantocianidinas), flavanones, flavones e isoflavonas⁽²⁹⁾.

1. Flavonoides: son compuestos polifenólicos con quince átomos de carbono, con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Son los compuestos fenólicos más numerosos y están presentes en altas concentraciones en la epidermis de las hojas y cascaras de las frutas. Estos compuestos juegan un papel importante como metabolitos secundarios.

Las principales clases de flavonoides son: 1) flavonas (estructuras básicas) por ejemplo: luteolina, la apigenina, diosmetina, sinensetina, gardenin, vitexina y baicaleína; 2) flavonoles (que tiene un grupo hidroxilo en la posición 3) por ejemplo: kaempferol, quercetina, galangina, datiscetina, morin, quercetagetina y miricetina; 3) flavanonas (enlaces saturados en las posiciones 2-3) por ejemplo: hesperetina, taxifolina, eriodictiol y naringenina; 4) flavan-3-ol por ejemplo: catequina y epicatequina; 5) isoflavonas por ejemplo: genisteína y coumestrol; 6) antocianidinas: cianidina, delphinidina, pelargonidina⁽²⁹⁾.

2. Antocianinas: son pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos. Representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano⁽³⁰⁾. Las antocianinas poseen diferentes funciones en la planta como son la atracción de polinizadores para la posterior dispersión de semillas y la protección de la planta contra los efectos de la radiación ultravioleta y contra la contaminación viral y microbiana. El interés por los pigmentos antociánicos e investigación científica se han incrementado en los últimos años, debido no solamente al color que confieren a los productos que las contienen sino a su probable papel en la reducción de las enfermedades coronarias, cáncer, diabetes; a sus efectos antiinflamatorios y mejoramiento de la agudeza visual y comportamiento cognitivo. A pesar de las ventajas que ofrecen las

antocianinas como sustitutos potenciales de los colorantes artificiales, factores como su baja estabilidad y la falta de disponibilidad de material vegetal limitan su aplicación comercial ⁽³¹⁾.

3. Catequinas: Poseen actividad antiinflamatoria, su presencia contribuye a una mejor conservación de los antocianos. Se localizan en semilla y hollejos en formas simples o polimerizadas ⁽³²⁾.
4. Proantocianidoles: llamadas proantocianidina oligomérica. Pueden ser absorbidos por las membranas celulares y protegerlas de radicales libres. Tiene la ventaja de ser lipo e hidrosoluble ⁽³²⁾.

Alcaloides: son compuestos heterocíclicos que generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos, tales como triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, solos o combinados con terpenoides. Los alcaloides se pueden dividir en los siguientes grupos: alcaloides isoquinolécicos, alcaloides quinolizidínicos, alcaloides pirrolizidínicos, alcaloides tropánicos y alcaloides indólicos ⁽²⁷⁾. Por su similitud química a moléculas que participan en la transmisión de las señales del sistema nervioso, el efecto tóxico de los alcaloides radica en su capacidad de bloquear neuroreceptores, intermediarios de la transducción de la señal neuronal y canales iónicos de vertebrados e insectos ⁽³³⁾.

2.3. HIPÓTESIS

H₀: Los extractos hidroalcoholicos de la corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq presentan actividad citotoxica *in vitro* sobre *Artemia franciscana*.

H₁: Los extractos hidroalcoholicos de la corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq no presentan actividad citotoxica *in vitro* sobre *Artemia franciscana*.

2.4 VARIABLES

2.4.1 Variable dependiente

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

Indicador:

- Concentración letal (CL₅₀).

2.4.2 Variable independiente

Extracto hidroalcohólico de corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq

Indicador:

- Concentraciones de extracto hidroalcohólico

Clasificación de toxicidad según CYTED ⁽³⁴⁾

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 puede evaluar la citotoxicidad de un tratamiento, en términos de concentraciones letales (CL ₅₀).	Ensayo para evaluar la citotoxicidad que presentan los extractos de las especies vegetales sobre los nauplios de <i>Artemia</i> spp., con la finalidad de conocer la concentración que tendrá un efecto tóxico en el 50% de la especie en experimentación y establecer la relación riesgo-beneficio que implicará el uso de estos extractos vegetales como alternativa medicinal.	Concentración letal (CL ₅₀).	Citotóxico: 1 – 1000 ug/mL. No citotóxico: >1000 ug/mL.	Tipo: Cuantitativo

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA	
Extracto alcohólico corteza <i>Maytenus</i> <i>macrocarpa</i> & Pav.) Briq	hidrol de de (Ruiz	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 de extractos 10ppm, 50ppm, 500ppm, 1000ppm y 1500ppm	Con actividad Sin actividad	Tipo : Cualitativo

CAPITULO III

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Tipo de estudio

- Correlacional: porque se relacionó diferentes concentraciones del extracto hidroalcoholico de la especie *Maytenus macrocarpa* con la muerte de los nauplios, que permitieron encontrar la concentración letal media (CL50)

3.2. Diseño de la investigación

Experimental: porque se trabajó con un diseño que midió la cantidad de nauplios muertos después de 24 horas de exposición a las diferentes concentraciones del extracto (10, 50, 500, 1000 y 1500 ppm respectivamente). Asimismo, se incluyó el control negativo (solución I.O.) y el control positivo ($K_2Cr_2O_7$ 400 ppm).

3.3. Población y muestra

Población vegetal: corteza de la especie vegetal

Muestra vegetal: *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq.

Criterio de Inclusión vegetal:

- Corteza limpia y en buen estado.

Criterio de exclusión vegetal:

- Corteza que evidencia contaminación.

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

Criterio de inclusión animal

- Nauplios.

Criterio de exclusión animal

- Quistes inviables.

3.4. Procedimiento experimental (Anexo 1)

3.4.1 Preparación de los extractos hidro-alcoholicos

- El material vegetal seco se picó y molió para luego proceder a la preparación del extracto hidro-alcohólico 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 ^(26,35)

3.4.2.1 Preparación de la muestra

3.4.2.1.1 Certificación de la especie vegetal

El Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de Amazonia Peruana – UNAP certificó la especie vegetal y entregó una constancia con su respectivo código de identificación (Ver Anexo 06).

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 inviábiles). Luego, se agregó 370 mL de solución de IO para su hidratación a

temperatura 25°C por 1 hora. Después, se colocó un pelele acuario (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: (Ver 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: (Ver 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 piceta cada tubo de ensayo.

3.4.3 Metabolitos secundarios: Determinación de los fenoles y alcaloides totales.

1. Fenólicos Totales

Los compuestos fenólicos se determinaron de acuerdo con la metodología de (Valls, 2013) ⁽³⁶⁾.

a) Extractos para Fenólicos Totales:

Con tres volúmenes de 25 mL de etanol absoluto, acidulado con 1 % de ácido fórmico, se extrajo 0.5 gramos de muestra seca y pulverizada, el extracto formado se puso a sequedad en una estufa a 40°C, hasta que volatice el etanol. El residuo seco se disolvió en una solución de metanol al 50 %, acidulado con 1 % de ácido fórmico y se llevó a un volumen de 10 mL, se guardó a -20°C hasta su análisis.

a.1. Antocianinas y Flavonoides Totales ⁽³⁶⁾.

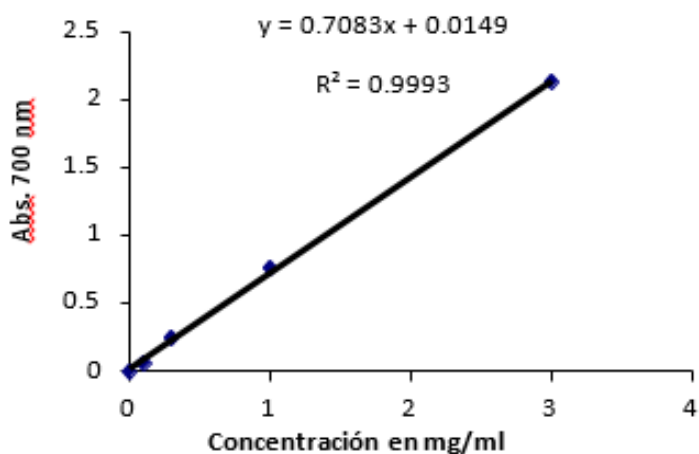
En una cubeta de poliestireno de 1.5 mL se adicionó 1 mL del extracto preparado en el punto A, se determinó antocianinas y flavonoides por espectrofotometría UV/vis a una absorbancia de 535 nm y 374 nm respectivamente.

a.2. Fenólicos Totales.

Mediante el índice de Folin se determinó el contenido de fenólicos totales, en un tubo de centrifuga (15 mL) se adicionó 40 µl de extracto con 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 2 mL de carbonato sódico al 20% (p/v), enrasando a 10 mL. Transcurrida media hora, se efectuó la lectura por

espectrofotometría a una absorbancia de 700 nm. Los compuestos fenólicos se determinan mediante la ecuación de la curva de calibración estándar $Y = 0.7083X + 0.0149$ y regresión lineal 0.9993 (figura 10).

Figura 10: Curva de calibración de fenoles totales.



Fuente: Valls 2013

a.3 Catequinas y Proantocianidoles:

Se determinó el contenido de catequinas y Proantocianidoles con el ensayo de vainillina, mezclando 0.5 mL del extracto, 1.25 mL de vainillina en metanol al 1% (p/v) y con 1.25 mL de ácido sulfúrico al 25% (v/v) en metanol. El blanco se preparó simultáneamente del mismo modo, pero sustituyendo la solución de vainillina por metanol. Pasado los 15 minutos, se efectuó la lectura por espectrofotometría a una absorbancia de 510 nm. Los compuestos de catequinas y Proantocianidoles se determinó mediante la ecuación de la curva de calibración estándar $Y = 0.04651X + 0.03283$ y coeficiente de determinación (R^2) de 0.9964. Para cada lectura se usó como control metanol grado analítico ⁽³⁶⁾.

2. Alcaloides Totales.

La determinación de los alcaloides totales se realizará mediante la metodología de Shamsa F *et al.*, (2008) ⁽³⁷⁾.

a) Preparación de soluciones.

- La solución verde bromocresol (BCG) se preparó calentando

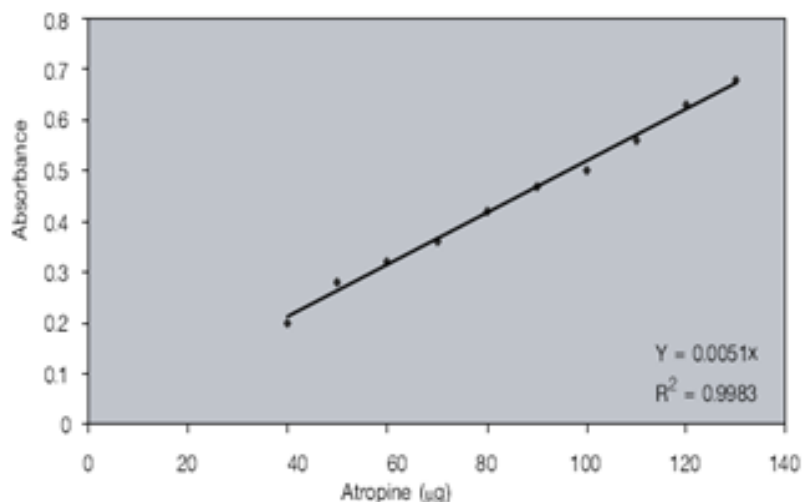
69,8 mg de bromocresol verde con 3 mL de NaOH 2N y 5 mL de agua destilada hasta que esté completamente disuelta y la solución se diluye hasta 1 L con agua destilada.

- Solución Tampón de fosfato: Se pesó 71,6 g de fosfato de sodio (Na_2HPO_4) y se disuelve con 1 L de agua destilada, esta solución se ajustó a un pH de 4.7 con 0.2 M de ácido cítrico. También se preparó 42,02 g de ácido cítrico y se disuelve en 1 L de agua destilada.

b) Tratamiento de las muestras

En cartuchos de papel filtro (Whatman), se pesó 5.0 g de muestra seca y micro pulverizada, se selló los cartuchos y se puso en el equipo soxhlet para extraer con metanol durante 16 horas (extracción continua). El extracto obtenido se puso a la estufa a 45°C hasta que volatice el metanol, el residuo seco fue disuelto con HCl 2N (15 mL aproximado) y se filtró para quitar impurezas. En una pera de decantación se puso 1 mL del extracto, lavándolo con 10 mL de cloroformo (3 veces), la solución lavada se ajustó a un pH neutro con NaOH 0.1 N, a esta solución se añadió 5 mL de solución de BCG y 5 mL de tampón de fosfato, agitándolo y el complejo formado se extrajo con 1, 2, 3 y 4 mL de cloroformo por agitación vigorosa. Los extractos se recogieron en una fiola aforada de 10 mL y se enrazó con cloroformo. La lectura se realizó por espectrofotometría a una absorbancia de 470 nm, los alcaloides se determinaron a través de la curva de calibración de Atropina ($Y = 0.0051X$) (Figura 11).

Figura 11: Curva de calibración de alcaloides.



Fuente: Shamsa F. *et al* 2008.

3. Análisis de saponinas: Para esta determinación se hizo uso del reactivo de Lieberman-Burchard (LB) para formar productos coloridos al reaccionar con saponinas. El reactivo LB consiste en una mezcla al 16,7 % de Anhídrido acético en Ácido sulfúrico concentrado. Inicialmente se elaboró una curva de calibración Absorbancia vs. Concentración con un estándar. Para esta curva se prepararon soluciones a las siguientes concentraciones: 0,00; 0,05; 0,1; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35 mg/m, de cada concentración se prepararon 2 mL, a los cuales se adicionaron 7 mL del reactivo de LB, se agitó 20 s con un vortex y se dejó en reposo 30 min. Finalmente se determinó la longitud de onda de la máxima absorción (λ max) para realizar las lecturas posteriores en el espectrofotómetro, se realizó un barrido con el estándar. (La λ max, de saponinas de quinua es de 528 nm) y a esta longitud de onda se realizaron las mediciones para la curva de calibración y posteriormente para las muestras seleccionadas. A partir de la curva de calibración se pudo cuantificar el porcentaje de saponinas presentes en la muestra evaluada ⁽³⁸⁾.

3.5. Materiales, equipos y reactivos

3.5.1. Materiales

Material vegetal: corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq.

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, pera de decantación 250 mL, 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, peleles, lámparas, equipo de venoclisis, cubetas de cuarzo.

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

3.5.2. Equipos: Espectrofotómetro, Rota vapor, Balanza analítica, potenciómetro, destilador de agua, desionizador, 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, cloroformo, bicarbonato de sodio, metanol, ácido sulfúrico, vainillina, ácido fórmico, verde de bromocresol, fosfato de sodio, ácido cítrico, Folin-Ciocalteu, carbonato sódico.

3.6. Instrumento de recolección de datos

Tarjetas de registro de farmacología (Ver 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 pisceta 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 calculó con el método de Finney (1971) ^(39,40). 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 30.

3.8. Consideraciones éticas

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 ⁽⁴¹⁾. Dentro de este contexto la presente investigación se enmarca en los principios expuestos por Rusell y Burch (1959), 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

CAPITULO IV

4.1 RESULTADOS

4.1.1. Actividad citotóxica:

Tabla 1. Cantidad de nauplios inyectados

Muestra	Extracto hidroalcohólico corteza de <i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq													
Concentraciones	10 ppm	50 ppm	500 ppm	1000 ppm	1500 ppm	I.O 3% (-)	K ₂ Cr ₂ O ₇ 400 ppm (+)							
Repeticiones														
1° réplica A	A ₁	20	B ₁	20	C ₁	20	D ₁	20	E ₁	20	F ₁	20	G ₁	20
2° réplica B	A ₂	20	B ₂	20	C ₂	20	D ₂	20	E ₂	20	F ₂	20	G ₂	20
3° réplica C	A ₃	20	B ₃	20	C ₃	20	D ₃	20	E ₃	20	F ₃	20	G ₃	20
TOTALS	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60

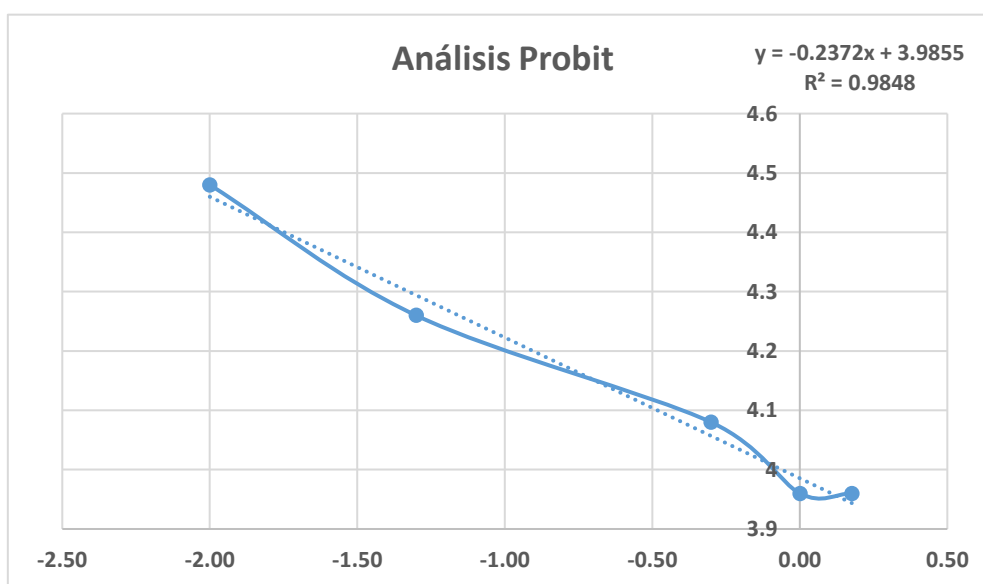
La tabla 1 muestra la cantidad de nauplios de *Artemia franciscana* inyectados en cada tubo de ensayo haciendo un total de 60 por cada una de las concentraciones evaluadas, más su respectivo control negativo y control positivo; todas ellas evaluadas en un tiempo de 24 horas.

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

[]	Repeticiones	Nauplios de <i>Artemia</i>		
		Total	Vivos	Muertos
10 ppm	A1, A2, A3	60	42	18
50 ppm	B1, B2, B3	60	46	14
500 ppm	C1, C2, C3	60	49	11
1000 ppm	D1, D2, D3	60	51	9
1500 ppm	E1, E2, E3	60	51	9
I.O. 3% (-)	F1, F2, F3	60	60	0
K ₂ Cr ₂ O ₇	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 18 nauplios muertos para la concentración de 10 ppm; 14 nauplios muertos para la concentración de 50 ppm; 11 nauplios muertos para la concentración de 500 ppm; 9 nauplios muertos para las concentraciones de 1000 ppm y 1500ppm respectivamente. 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 – corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq.



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 CL₅₀ a partir de la ecuación lineal: $y = -0,2372 + 3,9855x$, obtenida vía análisis Probit

Extracto	Ecuación	R ²	CL ₅₀ (ppm)
Hidroalcohólico de corteza de <i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq.	$y = -0,2372 + 3,9855x$	0,9848	5,2857

La tabla 3, muestra el valor de CL₅₀ de la corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq.

4.1.2. Metabolitos secundarios:

Tabla 4: Determinación de fenólicos totales

Especie vegetal	Antocianinas mg /100g	Flavonoides mg /100g	Fenólicos mg/100g	Catequinas y Proantocianidina mg/100g
<i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq.	67,25	91,62	5794,62	0,00278

Tabla 5: Determinación de alcaloides totales

Especie vegetal	Alcaloides mg/100g
<i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq.	20,32

Tabla 6: Determinación de Saponinas

Especie vegetal	Saponinas mg/100g
<i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq.	1227,08

En las tablas 4, 5 y 6 se detallan las concentraciones de los compuestos fenólicos alcaloides totales y saponinas en mg/100 g que se determinaron en la especie vegetal en estudio. La presencia de metabolitos secundarios como Flavonoides, y alcaloides puede ser la causa de la actividad citotóxica mostrada en las concentraciones del extracto evaluado.

4.2. DISCUSION

El presente estudio de investigación muestra los resultados obtenidos de la Citotoxicidad *in vitro* del extracto hidroalcohólico de corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq sobre *Artemia franciscana*.

El valor de CL₅₀ obtenida para la corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq fue: 5,2857 ppm.

En la evaluación de la citotoxicidad de los extractos de la especie vegetal sobre *Artemia franciscana*, nuestro estudio muestra un valor de CL₅₀= 5,2857 ppm y esto concuerda con lo declarado por Meyer *et al* 1982 ⁽⁴²⁾, “un valor de CL₅₀ inferior a 1000 ug / mL se considera bioactivo”; y, en sentido puede tener actividad biológica.

Desde el punto de vista de la acumulación de metabolitos secundarios en los organismos vivos, comparando con los resultados obtenidos en la tesis “valoración de ocho especies vegetales nativas de la comunidad tamshiyacutahuayo” ⁽⁴³⁾, a través de las actividades antioxidante, alelopático y metabolitos secundarios” se encontró que las especies vegetales *Virola pavonis* y *Xylopia benthamii* presentaron valores similares en cuanto al contenido de antocianinas de 64,19 y 64,16 mg/100g frente a 67,25 mg/100g; en contenido de flavonoides *Caryocar glabrum*, *Guatteria scytophylla* y *Tapirira guianensis* presentaron valores de 143,89, 144,18 y 144,11 mg/100g frente a 91,62 mg/100g. Con respecto a fenólicos *Virola pavonis*, *Xylopia benthamii* y *Lacmellea standleyi* presentaron valores de 32181,51, 25592,96 y 23298,74 mg/100g frente a 5794.62 mg/100g; en catequinas y proantocianidinas *Caryocar glabrum*, *Virola calophylla* y *lacmellea standleyi* presentaron valores de 0,177; 0,158 y 0,128 mg/100g frente a 0,00278 mg/100g de la especie estudiada.

4.3. CONCLUSIONES

Un valor de CL_{50} igual a 5,2857 ppm para la corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq, produce la actividad biológica de citotoxicidad.

El valor obtenido (5,2867 ug/ml) para la citotoxicidad de ésta especie, nos demuestra que es altamente tóxica, según lo declarado por Meyer *et al* 1982 (42).

La presencia de metabolitos secundarios, tales como: alcaloides, fenólicos y saponinas; puede ser la causa de la actividad citotóxica mostrada en el extracto hidroalcohólico de la especie vegetal estudiada.

4.4. RECOMENDACIONES

Realizar otros estudios químicos como: espectrofotometría de masa, ultravioleta visible (UV-Vis), cromatografía de columna, cromatografía de capa fina; a la corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq.

Determinar la toxicidad oral a dosis repetidas en ratas, del extracto metanólico de corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq.

Llevar a cabo estudios de toxicidad crónica por administración continua a 90 días, a fin de determinar posibles efectos tóxicos acumulativos.

4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Datos y cifras sobre el cáncer. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/> Fecha de acceso: 13 de diciembre 2017.
2. Sharapin, N (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Convenio Andrés Bello, Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología, bogotá.
3. Fatope M. Phytocompounds: Their bioassay and diversity. *Discov Innov.* 1995;7(3):229-235.
4. Hsu, T. The future of animals, cells, models and systems in Research Development, Education and testing. *Natl. Acad. Sci., Washington D.C.* pág. 180, 1977.
5. Ortuño B., Rosa U., Guzmán A. Ejecución de bioensayos y asistencia en estudios de impacto ambiental. *Educación en Ciencia y Tecnología del Mar. Guía de aprendizaje.* 2009.
6. McLaughlin J., Lingling L., Anderson J. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information J.* 1998;32:513-524.
7. 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.
8. 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/>

9. Kvist L., Oré I., Gonzáles A., Llapapasca C. Estudio de plantas medicinales en la Amazonía Peruana: Una evaluación de ocho métodos etnobotánicos. *Folia Amazónica*. 2001; 12(1-2): 53-71.
10. Stagegaard J, Sorensen M, Lars P. Estimations of the importance of plant resources extracted by inhabitants of the Peruvian Amazon flood plains. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 2002; 5(2): 103-122.
11. Apacla Pérez, Raúl Emilio; Pezo Lloja, Alis Fabiola. Evaluación de metales en corteza de *Maytenus macrocarpa* (Chuchuhuasi) de uso etnomedicinal en la región Loreto. Disponible en: <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/UNAP/3574> Fecha de acceso: 10 Junio 2018.
12. Angelica M. León Fernández, Lourdes L. Tupia Céspedes, Yessica Turriate Montaldo, Julio E. Maraví Rengifo, Alejandro J. Barrientos Herrera, Orlando J. Urbano Farje, Alberto A. Salazar Granara. Evaluación de la actividad analgésica central de las hojas de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. (**chuchuhuasi**) *Rev Cubana Plant Med* vol.19 no.4 Ciudad de la Habana oct.-dic. 2014 On-line ISSN 1028-4796. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962014000400007
13. Alosilla A., Chaves F., Ascaño A. Acción del extracto etanólico de las hojas de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz. Pav.) Briq. "chuchuhuasi" sobre la motilidad intestinal. *Horiz Med* 2013; 13(2): 6-11.
14. Medina C., Lopez A., Maeda A. Mejoramiento del desarrollo larval de *Artemia franciscana* por un consorcio bacteriano. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. México. 2012; 1
15. Pacheco J (2011). Determinación de la toxicidad aguda (CL₅₀) del extracto de polvillo de carbon frente a larvas de *Artemia franciscana*.

16. Barriga García, H. (1992). Flora medicinal de Colombia. Bogotá: Tercer Mundo.
17. Mostacero, J. (2002). Taxonomía de las Fanerógamas Útiles de Perú. Lima, Concytec.
18. Alonso, J. (2004). Tratado de fitofármacos y nutracéuticos. Buenos Aires, Argentina: Corpus. 45-46
19. Cuamácas, S. (1995). Árboles de los bosques interandinos del norte del Ecuador. Quito, Ecuador: Casa de la Cultura Ecuatoriana. 3-4.
20. De La Torre, L. (2008). Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Quito, Ecuador: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 2-3
21. Estrella, E. (1993). Salud y población indígena de la amazonía del Ecuador. Quito, Ecuador: El Simposio. 1-2
22. Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. BMC Biotechnology. 2002;2:17.
23. Brito, R, Gelabert, R. & Jimenez, J (2006), Efectos tóxicos del Niquel y el Zinc en *Artemia franciscana* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca). Universidad y ciencia, Vol. 22. 001: 65-74
24. 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

25. Osorio E (2009). Universidad de Antioquia Aspectos Básicos de Farmacognosia. Curso de Farmacognosia y Fitoquímica. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/32883/32902>
26. Varó I, Serrano R, Navarro JC. Acute lethal toxicity of the Organophosphorus pesticide Chlorpyrifos to different species and Strains of *Artemia*. Bull environ Contam toxicol. 1998;61:778-785.
27. Facchini, P.J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52:29-66
28. Thakur, M., Melzig, M.F., Fuchs, H., Weng, A. (2011). Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. Botanic: Targets and Therapy 1: 19–29.
29. Wina, E., Muetzel, S., Becker, K. (2005). The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Productions A Review. University of Hohenheim - Germany, Indonesian Research Institute for Animal Production – Indonesia.
30. Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. (2006). Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In: Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (Eds.), Plant Secondary Metabolites Occurrence Structure and Role in the Human Diet. Blackwell Publishing, Chennai, India, pp. 1–24.
31. Strack D, Wray V. The Anthocyanins. In: HARBONE JB, editor. The Flavonoides. Advances in Research Since 1986. Boca Raton FL: CRC Press; 1994.
32. Wagner GJ. Cellular and Subcellular Location in Plant Metabolism. In: CREASY L, HRAZDINA G. editors. Recent advances in Phytochemistry. New York: Plenum Press; 1982. p. 1-45.

33. Zamora, F. (2003). Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. AMV Ediciones. España. 225p.
34. 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.
35. Vanhaecke P, Persoone G. The ARC-Test: a standardized short-term routine toxicity test with *Artemia nauplii*. *Methodology and evaluation. Ecotoxicological testing for the marine environ.* 1984;143-157.
36. Valls J., et al., (2013). Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. Unidad de Enología. Dpto. de Bioquímica y Biotecnología, Universidad Rovira y Virgili (Taragona). Alimentación y tecnología, artículo consultado en el 2013. Pag. 1-6.
37. Shamsa F., Monsef H., et al. (2008). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some iranian medicinal plantas. Department of Medicinal Chemistry. Department of Pharmacognosy, Facultad of Pharmacy. Pag. 17-20.
38. Lozano M, Ticona E, Carrasco C, Flore G, Almanza G. Cuantificación de saponinas en residuos de quinua real. *Chenopodium quino. Willd. Revista Boliviana de Quimica.* 2012; Vol. 29, N°2, 128-135.
39. Liang P. y Macrae T. The synthesis of a small heat shock/alphacrystallin protein in *Artemia* and its relationship to stress tolerance during development. *Dev Biol,* (1999) 207:445-56. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10068475> Fecha de acceso: 30 de Abril 2017.

40. 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
41. 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.
42. 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.
43. Valoración de ocho especies vegetales nativas de la comunidad Tamshiyacu-Tahuayo, a través de las actividades antioxidante, alelopático y metabolitos secundarios. [Tesis de post grado para optar el grado académico de Maestro en Ciencias y Tecnologías ambientales con mención en auditoría y legislación ambiental en la industria]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (2018). Disponible en: <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/UNAP/5451> Fecha de acceso: 29 Marzo 2018

Anexo 1

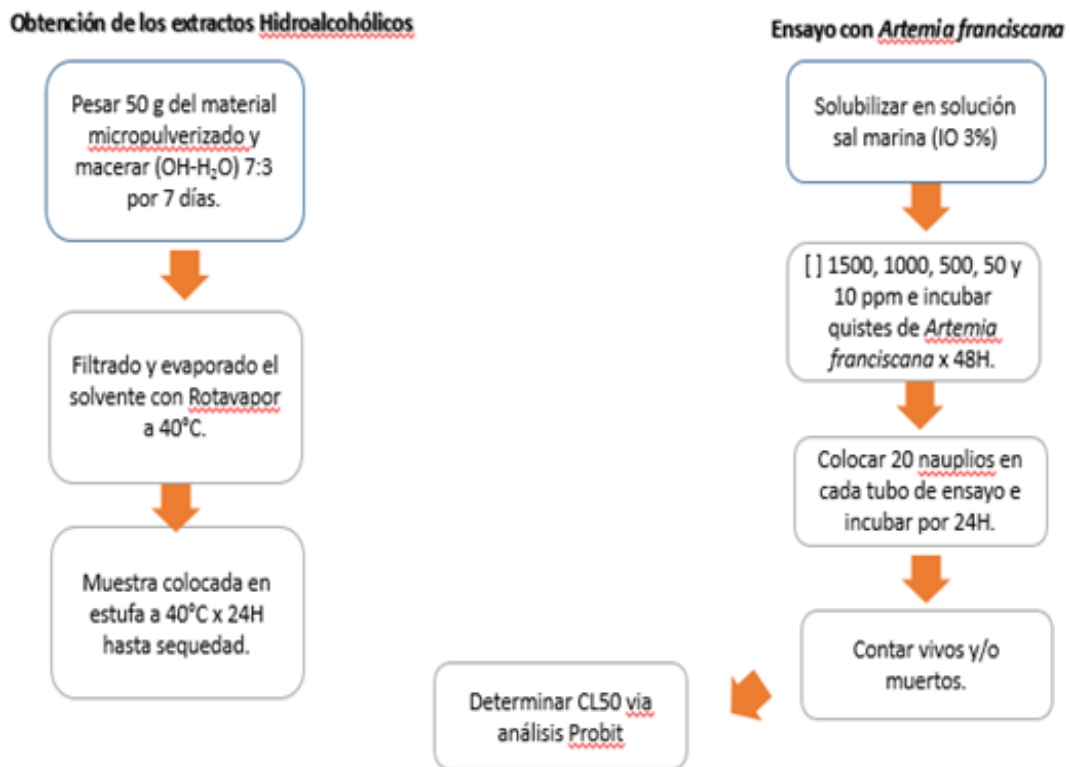


Figura 12. Flujograma del ensayo de la actividad citotóxica

Anexo 2

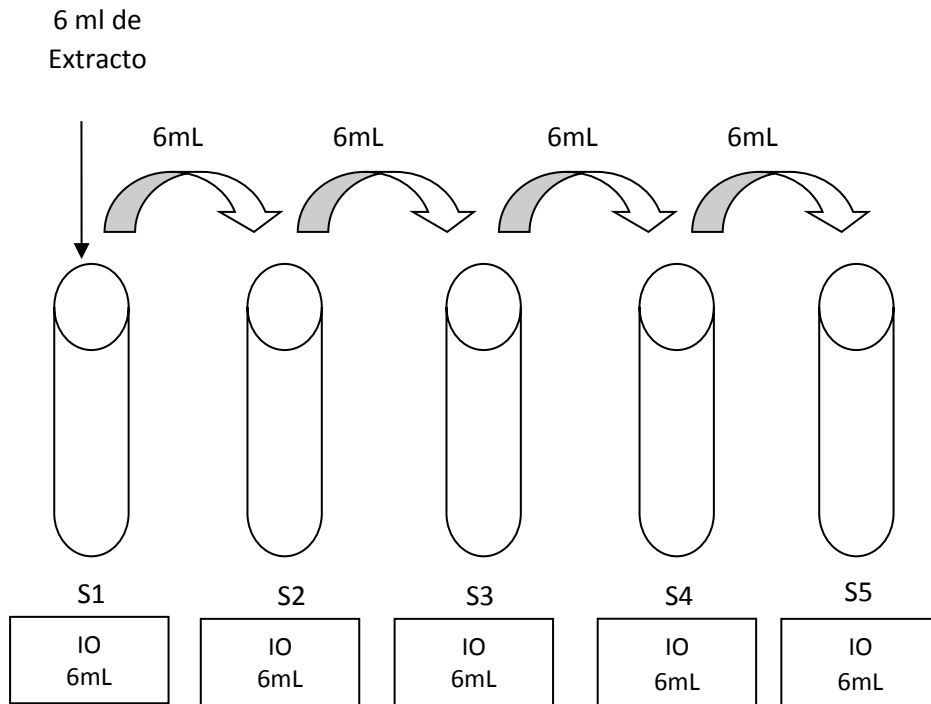


Figura 13. Esquema de dilución del extracto para el experimento de citotoxicidad

Anexo 3

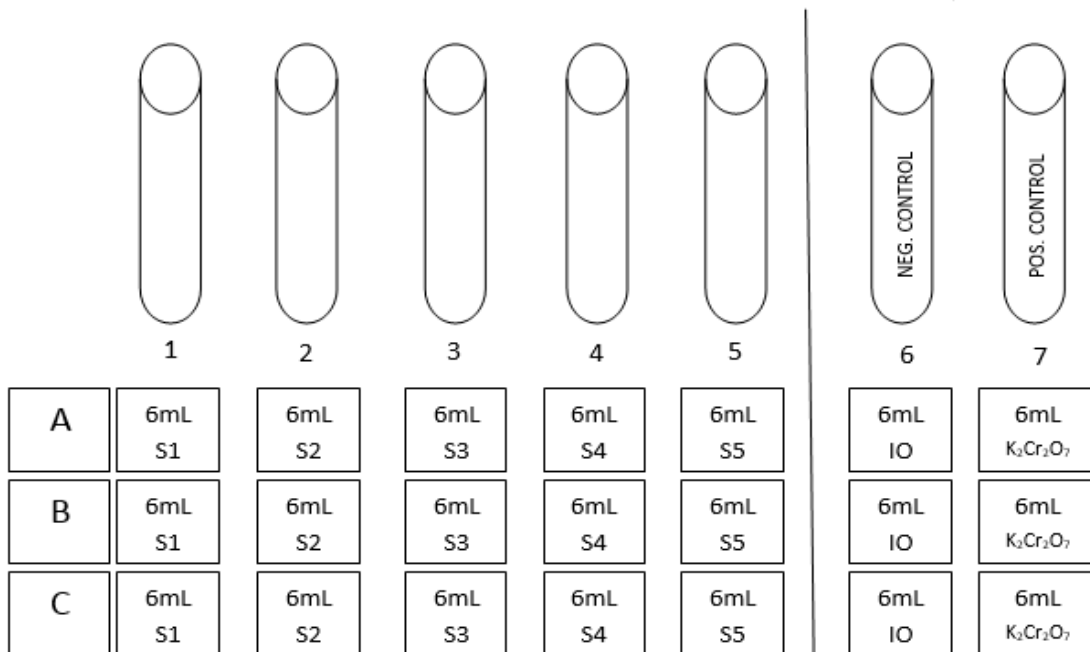


Figura 14. Configuración de esquema de experimento de citotoxicidad

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 $K_2Cr_2O_7$
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 $K_2Cr_2O_7$ (Control positivo)	S8 400	1ª Repetición A8				
		2ª Repetición B8				
		3ª Repetición C8				
		Total				

RESULTADOS Y CÁLCULO DE LA CL_{50} DE LA MUESTRA FRENTE A LAS LARVAS DE *Artemia*

Muestra	[c] ug/ml	Repeticiones	LARVAS DE ARTEMIA				CL_{50} ug/ml
			Total	Vivas	Muertas	%Letal	
(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_{50} ug/ml
			Total	Vivas	Muertas	%Letal	
Sol. IO 3%		total					
Solución $K_2Cr_2O_7$	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

 **UNAP**

Herbarium Amazonense – AMAZ
Centro de Investigación de Recursos Naturales

CONSTANCIA

LA COORDINADORA DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

HACE CONSTAR:

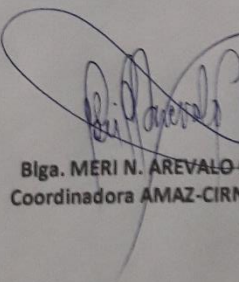

Que, las muestra botánica presentado por los señores **Erick Lucio Aspajo Julca** y **Lesman Sigvas Cisneros**, bachilleres de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, pertenecen a la tesis titulada: "**Citotoxicidad in vitro del Extracto Hidroalcohólico de Corteza de *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. Sobre *Artemia Franciscana***", y fue verificado y determinado por este Herbarium Amazonense-AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indica:

N°	Código	Familia	Especies	Nombre Común
1	0033887	CELASTRACEAE	<i>Maytenus macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq.	"chuchuasha"

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

Iquitos, 20 de Agosto del 2018

Atentamente,

Blga. MERI N. AREVALO GARCIA
Coordinadora AMAZ-CIRNA-UNAP

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

Registro 3: Constancia de certificación de la especie vegetal