

TÍTULO DEL PROYECTO

Evaluación de la toxicidad y bioseguridad de extracto etanólico de Passiflora tripartita, Passiflora edulis y Passiflora incarnata en Artemia salina y Danio rerio

SIGLAS

DANIA

TIPO DE PROYECTO

Basica

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Biodiversidad y botánica sistemática

DURACIÓN ESTIMADA

Fecha de inicio: 01/06/2017 Fecha de término: 04/12/2017

PARTICIPANTES

- CASTAÑEDA MARIN ELIO ALVARO (ESTUDIANTE) — 000125656
- MARIN TELLO CARMEN LUISA (COORDINADOR(INV. PRINCIPAL)) — 000095226

INSTITUCIÓN O LUGAR A EJECUCARSE

- UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUIJILLO (LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS)
- UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO - UPAO (LABORATORIOS DE MEDICINA VETERINARIA)

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cuál es el grado de toxicidad y bioseguridad del extracto etanólico de Passiflora tripartita, P. edulis y P. incarnata en Artemia salina y Danio rerio?

II. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Las plantas medicinales han formado parte importante de la historia y cultura de todos los países del mundo. Su uso y aplicaciones en la cura de diversas enfermedades y dolencias, constituye un conocimiento que, aun en nuestros días, se transmite de generación en generación. Durante muchos años los investigadores han estudiado las propiedades de diversas especies vegetales, concentrándose en sus propiedades medicinales, para ser puestas al servicio de la comunidad, encontrando una forma alternativa de aliviar los problemas de salud ^{1, 2}.

En la actualidad en grandes sectores de la población peruana y específicamente en las zonas rurales del Perú, se viene utilizando como tradición heredable a través de cuantiosas generaciones a las plantas medicinales; debido a que sus hojas, flores, semillas, cortezas, raíces,

frutos o cualquier otro órgano de la planta posee propiedades terapéuticas sustentadas empíricamente y que son aprovechadas por los pobladores haciendo uso de la materia vegetal en forma de infusiones, decoctos, baños, emplastos, frotaciones y otros ^{3,4}.

Debido a que los fármacos traen demasiados efectos colaterales, actualmente se vienen usando las plantas medicinales que son aquellos vegetales que elaboran unos metabolitos secundarios, llamados "principios activos", sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial, a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie las enfermedades o restablezca la salud perdida. Constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies existentes⁵. Las formas como se utilizan es a través de infusiones, cocimientos, extractos, tinturas, jarabes, polvo, gotas, jugo o zumo, maceración y baños, etc⁵⁻⁶. La investigación científica ha permitido descubrir una variada gama de principios activos, de los cuales los más importantes desde el punto de vista de la salud, son los aceites esenciales, los alcaloides, los glucósidos o heterósidos, los mucílagos y gomas, y los taninos. Existen en las plantas otros principios activos relevantes denominados nutrientes esenciales, como las vitaminas, minerales, aminoácidos, carbohidratos y fibras, azúcares diversos, ácidos orgánicos, lípidos y los antibióticos⁶.

El género *Passiflora* tiene efectos depresores sobre el sistema nervioso central, según algunos estudios realizados tienen efectos ansiolíticos, sedantes, tranquilizantes, calmantes y contra el insomnio.⁷⁻⁸ La parte de la planta que contiene los principios activos que ejercen el efecto ansiolítico es la parte aérea y los compuestos que inicialmente se reportó como los ansiolíticos fue la fracción rica en alcaloides y rica en flavonoides eran responsables por la producción de los efectos sedantes. Sin embargo, la fracción de alcaloides demostró poseer actividad estimulante, tanto in vitro como in vivo, por lo cual el supuesto efecto farmacológico ha sido cuestionado. Entonces ha recaído todo el efecto en los flavonoides específicamente la crisina, como el causante del efecto sedante y ansiolítico. En la actualidad varios estudios han reconocido la presencia de flavonoides como la crisina, que poseen afinidad por el receptor GABA, por lo tanto armonizan la actividad de los canales de Cl⁻ en las neuronas ejerciendo efectos ansiolíticos⁷

A raíz de la aparición de algunos efectos tóxicos y de comprobar que pueden interactuar con fármacos convencionales, desde diversas instancias profesionales se ha recomendado mejorar el conocimiento y extremar la vigilancia sobre el uso de la medicina natural⁸

El ensayo de *Artemia franciscana* es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los materiales en larvas, y de esta manera se predice su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos y ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos ⁹⁻¹¹

El pez cebra es único para obtener y mantener miles de mutantes gracias a sus especiales características; muchos de los fenotipos de los mutantes del pez cebra ya obtenidos se parecen a algunas enfermedades genéticas caracterizadas en el hombre, aportando un poderoso

instrumento para ahondar en las correspondientes patologías humanas. Aunque se sabía que el genoma del hombre y el del ratón contenían regiones de genes muy similares (sinténicos), no se esperaba que las estructuras de los cromosomas del pez cebra se parecieran tanto a las humanas. Es por ello que se pueden buscar genes candidatos a enfermedades o anomalías en regiones cromosómicas humanas definidas por mutaciones en el pez cebra. Las alteraciones morfológicas en el desarrollo embrionario del pez cebra se han utilizado desde hace años para estudiar los efectos de los contaminantes ¹².

III. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO (IMPORTANCIA, BENEFICIARIOS, RESULTADOS ESPERADOS)

La demanda de productos naturales se encuentra en aumento debido a que lo orgánico o natural tiene la imagen de salud y porque los productos sintéticos dentro de ellos los fármacos, traen consigo el legado de reacciones adversas o efectos colaterales. La población según la Organización Mundial de la Salud (OMS) utiliza en un 80% las plantas medicinales, sin embargo éstas, pueden interactuar con fármacos convencionales y podrían tener efectos tóxicos.

Se hace necesario por lo tanto, extremar la vigilancia sobre el uso de la medicina natural y realizar estudios que permitan brindar la seguridad de uso de estos productos, que como toda sustancia externa, representará siempre cierto nivel de riesgo para el organismo humano.

Al respecto los ensayos de toxicidad en modelos animales como *Artemia salina* (Camarón de mar), permiten obtener información sobre las dosis mínimas y máximas de los extractos de plantas y los ensayos de bioseguridad en *Danio rerio* (Pez cebra) permitiría conocer la posibilidad de teratogenicidad y embriotoxicidad de los mismos, ambas especies poseen alta sensibilidad celular a compuestos tóxicos que podrían estar afectando también a la célula humana.

En este estudio, se pretende obtener conocimiento de las dosis de extractos del género *Passiflora* procedentes de la Región La Libertad, que ocasionarían efectos tóxicos, mediante el ensayo con *Artemia salina* así como la dosis que produce embriotoxicidad y teratogenicidad en *Danio rerio* (Pez cebra), considerando que este género es de amplio uso en la población por sus propiedades ansiolíticas, tranquilizantes o calmantes, lo que representaría un beneficio importante para los dolientes de esta área de la salud mental considerada como una de las prioridades sanitarias en el país y el mundo.

IV. OBJETIVOS

GENERAL:

Determinar la toxicidad y la bioseguridad del extracto etanólico de *Passiflora tripartita*, *edulis* e *incarnata* en *Artemia salina* y en *Danio rerio*

ESPECIFICOS:

1. Caracterizar de acuerdo a la CL50 el grado de toxicidad del extracto de la hoja de **las tres *Passifloras estudiadas*** en larvas ***Artemia salina* L.**
2. Evaluar la bioseguridad del extracto a través de la evaluación de las siguientes características (*apical endpoints*): número de huevos coagulados, irregularidades en la formación de somites, no despegado de la cola, ausencia del latido cardíaco, edemas y malformaciones en general.

En adultos: , se evaluará el comportamiento de los peces, y se registrarán los tiempos y dosis mínimas necesarias para causar la muerte o un efecto tóxico detectable

V. MARCO TEÓRICO

El género *Passiflora* es el más grande de la familia *Passiflorácea*, comprende cerca de 500 especies (13), ninguna se caracteriza por poseer un alto contenido de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, excepto la *Passiflora mollísima* Kunth, L.H. Bailey (curuba) o tumbo serrano en Perú.

El género *Passiflora* constituye una enorme riqueza, tanto a nivel económico, como nutricional y de recursos genéticos. Algunas pasifloras tienen propiedades sedativas, antiespasmódicas y "antibacteriales". Es bien conocido por sus usos comerciales, muchas especies son ampliamente cultivadas para la producción de frutas. Otras especies se utilizan como plantas ornamentales por sus flores de colores vivos. El conocimiento farmacológico del género *Passiflora* indica su potencial para el desarrollo de fármacos ansiolíticos y sedantes. Un número significativo de especies ha sido utilizado en la medicina popular tradicional en muchos países, como remedio para tratar la ansiedad, el insomnio, la histeria, la epilepsia, los espasmos y el dolor (14)(15).

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. (16)

El ensayo de *Artemia franciscana* fue propuesto por Mc Laughlin (1991) y es muy útil en los bioensayos de laboratorios con el fin de determinar la toxicidad por la estimación de la concentración(17), fue descrita en el siglo XVIII y ha sido extensamente estudiada desde el siglo

XIX. Cuando las condiciones ambientales son adversas, su principal propiedad es la de producir formas de resistencia llamadas quistes. Después de un período de incubación aproximado de 24 a 48 horas en concentraciones óptimas de oxígeno y salinidad, emergen larvas (nauplios) que pueden administrarse directamente como alimento vivo a una gran variedad de organismos acuáticos o pueden ser contabilizadas al realizar los ensayos de toxicidad frente a diversas concentraciones de los extractos (18)

Para determinar la toxicidad de una sustancia se utiliza este bioensayo de dosis letal 50, este corresponde a la dosis estadística que causa la muerte del 50 % de los animales tratados en un periodo determinado. Para determinar el daño agudo a nivel celular que provoca un extracto se utiliza como parámetro la concentración. En el bioensayo de concentración letal 50 se estiman los efectos perjudiciales de la sustancia en estudio a través de la respuesta observada en los organismos expuestos a un rango de concentraciones durante un periodo determinado. En la presente investigación será contabilizando los nauplios de *Artemia salina* L. (19)

De igual modo el ensayo en *Danio rerio* o Pez cebra, permite obtener información sobre la toxicidad en el pez adulto así como en sus embriones. Estudios previos muestran que se puede evaluar compuestos procedentes de plantas medicinales y potenciales sustancias biocombustibles, por toxicidad embrionaria aguda y teratogenicidad utilizando la prueba de toxicidad del embrión de peces (Fish Embryo Toxicity FET). Identificar potenciales de riesgo desconocidos y permitir focalizar la investigación adicional en sustancias con potenciales tóxicos bajos. La prueba FET es ampliamente aceptada y utilizada en (eco) toxicología, debido a que es un modelo de organismo útil para la predicción de la teratogenicidad humana.(20)

Asímismo este modelo permite estudiar los mecanismos moleculares para identificar las alteraciones en su expresión génica.(21)

El grupo de investigación del doctor John P. Berry (2007) de la Universidad de Miami desarrolló un método para la detección y caracterización de toxinas provenientes de algas marinas y de agua dulce. En particular, trabajaron con toxinas lipofílicas que afectaron el desarrollo de embriones del pez cebra. Este método es sensible y contribuye al entendimiento de los mecanismos de acción de estas toxinas, sin embargo no resulta rápido ni eficaz como bioensayo de control para los lotes de bivalvos a fin de ser liberados al mercado. Por otro lado, Lefebvre y col. (2009) utilizaron peces cebra adultos en ensayos con ácido Domoico y toxina amnésica mediante administración intraperitoneal. Estos estudios se llevaron a cabo con el fin de analizar dosis subletales y evaluar los mecanismos de acción del ácido Domoico. Aunque no se realizó con el fin de desarrollar un método para la determinación de toxinas marinas, la vía de administración de este ensayo resulta de gran interés, dado que puede ser utilizada para la optimización de un bioensayo de cuantificación de toxinas marinas. (22)

Estas características convierten al pez cebra en un modelo vertebrado muy versátil y apto para estudios *in vivo* de toxicidad, cuya instalación en los laboratorios de toxicología permitiría,

adicionalmente, la adopción de nuevas técnicas para la realización de ensayos en alimentos, aguas residuales y otras matrices (23)

Unir ambos ensayos permitiría un gran beneficio a la población al obtener el conocimiento para el uso más seguro de los extractos de las hojas de *Passiflora*, considerando que en la actualidad no existen estudios al respecto.

VI. HIPÓTESIS

El extracto de las hojas de *las tres Passifloras* tienen un grado de toxicidad entre tóxico y no tóxico en larvas de *Artemia franciscana* y en *braquias de Danio rerio*

El extracto de las hojas de las tres *Passifloras* presenta bioseguridad al ser expuestos a *Danio rerio* (Pez cebra)

VII. METODOLOGÍA

Se adjunta en anexo

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Juscafresca B. Guía de la flora medicinal. 1° ed. Edit. AEDOS. España-Barcelona. 1995.pp:9-10,15-16
2. Phioda A. Plantas y salud. 1° ed. Edit. Susaeta Checoslovaquia-Praga.1991. pp: 7-9, 13-14
3. Mostacero J. Plantas medicinales del Perú. 1° ed. Edit. Asamblea Nacional de Rectores. Perú. 2011. pp:1-2
4. Muñoz F. Plantas Medicinales y Aromáticas. (1° ed). Ed.Mundi-Prensa. España. 2002. pp: 15-16.
5. Van G .Apuntes del Máster y Diplomatura de posgrado de la UAB “Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo 2. (2003). Cultivo de plantas medicinales. Tecnología y Producción.”
6. Hernández D. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Andrés Bello. Chile 2006. %5BEn línea%5D%5BFecha de acceso: 03 de Septiembre del 2016%5D URL Disponible en: <http://phytomedchile.blogspot.pe/2006/05/passiflora-incarnata-sedante-e.html>.
7. Pallo M. Evaluación del efecto ansiolítico del extracto hidroalcohólico de flor de granadilla (*Passifloraligularis*) en *Mus musculus var albinus*. %5BEn línea%5D%5BFecha de acceso: 03 de Septiembre del 2016%5D URL Disponible en: <http://dSPACE.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2452/1/56T00319.pdf>.
8. Rocha Bogó, Diacui. Uso de las Plantas Medicinales en Pediatría y Medicina Folclórica.

Universidad Abierta Interamericana, Sede Regional Rosario, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Agosto 2008. (Acceso: 7 Noviembre 2015) Disponible en:
<http://imgbiblio.vaneduc.edu.ar/fulltext/files/TC081578.pdf>

9. Fatope M. Phytocompounds: Their bioassay and diversity. *Discov Innov.* 1995; 7(3):229-235.
10. 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. (Acceso: 2013 Agosto 28)
11. 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. (Acceso: 28 Agosto 2013)
12. Francisco Prieto García¹, Oliveria Araceli Báez Ramírez¹, Williams Scoot², Juan C. Gaytán Oyarzún², Armida Zúñiga Estrada¹ Acumulación, toxicidad y teratogénesis provocada por presencia de arsénico en aguas en el pez cebra (*Danio rerio*). *Revista AquaTIC*, n° 24, pp72-85. Año 2006. ISSN 1578-4541
13. Rojano BA, Zapata-Acosta K, Cortes-Correa F. Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba). *Rev Cuba Plantas Med.* 2012;17(4):408–19.
14. Álvarez OB, Alberto J, Rodríguez C, Morgado AR, Alberto K, Rodríguez C. Utilidad de la fitoterapia en el insomnio . *Fitotherapy usefulness in the insomnia* . 2012;18(6).
15. de Pabón LMC., Turbay S., Rojano B., Álvarez LM., Restrepo SL., Álvarez JM., et al. Some *Passiflora* species and their antioxidant capacity %5BA algunas especies de *Passiflora* y su capacidad antioxidante%5D. *Rev Cuba Plantas Med.* 2011;16(4):354–63.
16. Pino Pérez O, Lazo FJ. ENSAYO DE Artemia: ÚTIL HERRAMIENTA DE TRABAJO PARA ECOTOXICÓLOGOS Y QUÍMICOS DE PRODUCTOS NATURALES. *Rev Protección Veg.* 2010;22(1):34–43.
17. McLaughlin JL, Rogers LL, Anderson JE. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. *Ther Innov Regul Sci* %5BInternet%5D. 1998;32(2):513–24. Available from:
<http://dij.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/009286159803200223>
18. Correa F, Fernando L, Ramírez B. (Anostraca%u202F: Artemiidae) Artemia fue descrita en el siglo XVIII y ha sido extensamente estudiada desde el siglo XIX (Sorgeloos 1980). Cuando las condiciones ambientales son adversas , su principal propiedad es la de producir formas de resistencia I. 1993;41(1):103–10.
19. Goodman L, Gilman A. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 8° ed. Edit.: Médica Panamericana. México. 1991. pp: 64-69
20. Bluhm K, Seiler T-B, Anders N, Klankermayer J, Schaeffer A, Hollert H. Acute embryo toxicity and teratogenicity of three potential biofuels also used as flavor or solvent. *Sci Total Environ.* 2016;566–567.
21. Wei L, Sun B, Song L, Nie P. Gene expression profiles in liver of zebrafish treated with microcystin-LR. 2008;26:6–12.
22. Barrio D, Ciencias D De, Sede DI, De A. El Pez Cebra (*Danio rerio*) Como Un Sistema Modelo Para La Valoración Biológica De Las Toxinas Producidas Por La Marea Roja the Zebrafish (*Danio rerio*) As a Model System for Biological Evaluation of the Toxins Produced

- By the Red Tide. 2015;1–9.
23. McCabe W. Operaciones Unitarias en ingeniería química. 7^o, ed. México: Mc Graw Hill; 2007. pp: 799, 835.
 24. Chumacero T. EFECTO TOXICO DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE *Ocimum Basilicum* EN LARVAS DE *Artemia Franciscana*. %5BTesis de pregrado%5D. Peru: Universidad de privada Antenor Orrego; 2013.
 25. Li Y, Sun B, Wu H, Nie P. Effects of pure microcystin-LR on the transcription of immune related genes and heat shock proteins in larval stage of zebra fish (*Danio rerio*). *Aquaculture* %5BInternet%5D. 2009;289(1–2):154–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.029>
 26. Barrio D, Ciencias D De, Sede DI, De A. El Pez Cebra (*Danio Rerio*) Como Un Sistema Modelo Para La Valoración Biológica De Las Toxinas Producidas Por La Marea Roja the Zebrafish (*Danio Rerio*) As a Model System for Biological Evaluation of the Toxins Produced By the Red Tide. 2015;1–9.
 27. Braunbeck T, Lammer E. Fish embryo toxicity assays. *Contract* %5BInternet%5D. 2006;20(203):725–31. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10811-007-9182-7>
 - 28.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	INICIO	FIN
Recolección de Passifloras	01/06/2017	30/06/2017
Preparación del extracto etanólico de muestras seleccionadas	01/07/2017	31/07/2017
Adquisición de dispositivos para pruebas con Artemia salina y Danio rerio	01/08/2017	31/08/2017
Realización de ensayo de toxicidad con Artemia salina	01/09/2017	30/09/2017
Realización de ensayo de bioseguridad en Danio rerio	01/10/2017	30/11/2017
Informe Parcial del Proyecto	14/10/2017	21/10/2017
Análisis estadístico	01/12/2017	10/12/2017
Elaboración del informe de investigación	11/12/2017	11/01/2018
Elaboración de artículo de investigación	11/12/2017	11/01/2018
Informe Final del Proyecto	11/01/2018	12/01/2018

PRESUPUESTO

DESCRIPCION	CANTIDAD	PRECIO_UNITARIO	PRECIO_PARCIAL
Material biológico (plantas)	10 KG	20	200
Material biológico (Animales experimentación)	1 UNI	250	250
Material biológico (Animales experimentación)	200 UNI	5	1000
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	25	25
REACTIVOS E INSUMOS	100 UNI	25	2500
ALIMENTACION	2 UNI	120	240
Libros y/o revistas	5 UNI	150	750
EMPASTADO	4 UNI	50	200
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	25	25
Material biológico (plantas)	10 KG	20	200
APOYO	7 UNI	200	1400
CONSULTOR	1 UNI	100	100
Cursos de Capacitación	2 UNI	1000	2000
Material biológico (plantas)	10 KG	20	200
REACTIVOS E INSUMOS	10 UNI	25	250
MATERIAL DE VIDRIO	10 UNI	100	1000
Alimento	10 KG	20	200
HOSPEDAJE	2 UNI	100	200
PASAJES	2 UNI	170	340
Publicación articulo	1 UNI	2600	2600
REACTIVOS E INSUMOS	300 UNI	1	300
PAPEL BOND	1 UNI	25	25
FOTOCOPIAS	500 UNI	0.10	50
			Total 14055