



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

Evaluación toxicológica de los extractos metanólicos de *Peperomia sp* y *Otholobium mexicanum* mediante la técnica de toxicidad aguda en embriones de peces en el modelo de *Danio rerio*.

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Bioquímica
Farmacéutica

Autoras:

Paola Estefanía Espinoza Cabrera

Odalys Stefanía Heredia Andino

Directora:

Dra. Eugenia Peñaherrera Wilches

ORCID: 0000-0002-9042-5058.

Cuenca, Ecuador

2023-10-12

Resumen:

El uso de plantas medicinales es una práctica tradicional en diversas partes del mundo, incluyendo Ecuador, donde las especies vegetales de *Peperomia sp* y *Otholobium mexicanum*, son usualmente empleadas para el tratamiento de diversas afecciones. Sin embargo, a pesar de su amplio uso, los estudios relacionados a su toxicidad son escasos o nulos. Por este motivo, el presente estudio evaluó la toxicidad y teratogenicidad de los extractos metanólicos de *Peperomia sp* y *Otholobium mexicanum* mediante los criterios establecidos en el documento número 236 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), obteniendo la concentración letal 50 (LC₅₀) de 4,7556 µg/mL para *Peperomia sp* y de 5.0282 µg/mL para *Otholobium mexicanum*, en el caso de la teratogenicidad en las dos plantas se pudieron evidenciar todos los criterios de teratogenicidad establecidos. Estos resultados permiten concluir que los extractos metanólicos de las dos plantas de estudio son tóxicos y teratogénicos para los organismos empleados como modelos experimentales.

Palabras clave: toxicidad, pez cebra, teratogenicidad, *Peperomia sp*, *Otholobium mexicanum*



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract:

The use of medicinal plants is a traditional practice in various parts of the world, including Ecuador, where the species of *Peperomia sp* and *Otholobium mexicanum* are usually used in traditional medicine for the treatment of various conditions. However, despite the widespread use in the population, studies related to toxicity of these plants are scarce or null.

For this reason, the present study evaluated the toxicity and teratogenicity of the methanolic extracts of *Peperomia sp* and *Otholobium mexicanum* using the criteria established in document number 236 of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), obtaining the lethal concentration 50 (LC₅₀) of 4.7556 µg/mL for *Peperomia sp* and 5.0282 µg/mL for *Otholobium mexicanum*, in the case of teratogenicity in the two plants all the established teratogenicity criteria could be evidenced. These results allow us to conclude that the methanolic extracts of the two study plants are toxic and teratogenic for the organisms used as experimental models.

Keywords: toxicity, zebrafish, teratogenicity, *Peperomia sp*, *Otholobium mexicanum*



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Resumen:	2
Abstract:	3
Índice de figuras	6
Índice de tablas	7
ABREVIATURAS	8
DEDICATORIA	9
AGRADECIMIENTO	11
INTRODUCCIÓN	12
CAPÍTULO I	15
1. MARCO TEÓRICO	15
1.1. DESCRIPCIÓN DE LAS PLANTAS OBJETO DE ESTUDIO	15
1.1.1. <i>Peperomia sp.</i>	15
1.1.2. <i>Otholobium mexicanum.</i>	16
1.2. MODELO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN DE PEZ CEBRA (<i>DANIO RERIO</i>).	18
1.3. PRINCIPIOS DE TOXICIDAD AGUDA.	25
1.3.1. Toxicidad Letal Aguda.	25
1.3.2. Toxicidad Aguda según Documento 236.	26
1.3.3. Concentración Letal 50.	27
1.3.4. Teratogenicidad.	27
1.4. PROCESOS GENERALES PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES.	28
1.4.1. Percolación.	28
1.4.2. Liofilización.	29
CAPÍTULO II	30
2. MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.1. Materiales y equipos	30
2.2. Tipo de diseño	30
2.3. Áreas de recolección y obtención de las muestras.	30
2.3.1. Recolección de plantas medicinales.	30

2.3.2.	Recolección y preparación de la muestra vegetal.	31
2.4.	Obtención de extractos.	31
2.4.1.	Humectación de la materia vegetal.	31
2.4.2.	Percolación de la Materia Vegetal.	32
2.4.3.	Concentración del extracto.	32
2.4.4.	Evaporación del extracto con Nitrógeno.	32
2.4.5.	Liofilización de los extractos concentrados.	32
2.5.	Evaluación de toxicidad con el modelo <i>Danio rerio</i>.	33
2.5.1.	Preparación del medio de disolución.	33
2.5.2.	Recolección y calidad de huevos.	33
2.5.3.	Selección de los embriones.	34
2.5.4.	Preparación de los controles.	34
2.5.5.	Preparación de las placas de trabajo.	35
2.6.	Valoración de los resultados.	36
2.7.	Procesamiento de datos.	37
CAPÍTULO III.		38
3.1.	Rendimiento de los extractos metanólicos.	38
3.1.1.	<i>Peperomia sp.</i>	38
3.1.2.	<i>Otholobium mexicanum.</i>	38
3.2.	Toxicidad aguda.	38
3.2.1.	<i>Peperomia sp.</i>	39
3.2.2.	<i>Otholobium mexicanum.</i>	40
3.2.3.	Concentración letal 50.	41
3.3.	Teratogenicidad.	43
3.3.1.	<i>Peperomia sp.</i>	43
3.3.2.	<i>Otholobium mexicanum.</i>	47
4.	Conclusiones.	52
5.	Recomendaciones.	53
6.	Referencias.	54
Anexos.		58

Índice de figuras

Figura 1. Congona, <i>Peperomia</i> sp.....	16
Figura 2. <i>Otholobium mexicanum</i>	17
Figura 3. Pez cebra adulto.	19
Figura 4. Usos del pez cebra en modelos de enfermedades.....	20
Figura 5. Similitudes en el desarrollo de Humanos, ratas y peces cebra.....	21
Figura 6. Etapas del desarrollo de Pez cebra.....	24
Figura 7. Criterios de teratogenicidad.	27
Figura 8. Esquema general de percolación.	29
Figura 9. Esquema de pipeteo.	35
Figura 10. Esquema general de procedimiento para la evaluación de letalidad y teratogenicidad de plantas medicinales.....	36
Figura 11. Coagulación a 24 hpf 25 µg/mL <i>Peperomia</i> sp.	39
Figura 12. Coagulación tardía 96 hpf 6.25 µg/mL <i>Otholobium mexicanum</i>	40
Figura 13. LC ₅₀ para el extracto de <i>Peperomia</i> sp.....	41
Figura 14. LC ₅₀ para el extracto de <i>Otholobium mexicanum</i>	42
Figura 15. Retardo de crecimiento y Deformación de yema en embriones expuestos a <i>Peperomia</i> sp.....	44
Figura 16. Malformación de cola en embriones expuestos a <i>Peperomia</i> sp.	45
Figura 17. Edema pericárdico en embriones expuestos a <i>Peperomia</i> sp.	46
Figura 18. Malformación de columna en embriones expuestos a <i>Peperomia</i> sp.	46
Figura 19. Deformación de yema en embriones expuestos a <i>Otholobium mexicanum</i>	48
Figura 20. Malformación de cola en embriones expuestos a <i>Otholobium mexicanum</i>	48
Figura 21. Edema pericárdico en embriones expuestos a <i>Otholobium mexicanum</i>	49
Figura 22. Malformación de la columna en embriones expuestos a <i>Otholobium mexicanum</i>	50

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía del Pez cebra.....	18
Tabla 2. Etapas de desarrollo de pez cebra y su correlación con el ser humano (García et al., 2016)	20
Tabla 3. Principales etapas de desarrollo de pez cebra.	22
Tabla 4. Coordenadas de recolección de muestra botánica <i>Peperomia</i> sp.	30
Tabla 5. Coordenadas de recolección de muestra botánica <i>Otholobium mexicanum</i>	30
Tabla 6. Criterios de validación de prueba FET OECD, 2013.....	33
Tabla 7. Especificaciones de las concentraciones empleadas para ESPINOZA 01.	34
Tabla 8. Especificaciones de las concentraciones empleadas para HEREDIA 01.....	35
Tabla 9. Lista de criterios empleados para valorar la letalidad.	36
Tabla 10. Lista de criterios empleados para valorar la teratogenicidad.	37
Tabla 11. Letalidad de extracto metanólico de <i>Peperomia</i> sp. registrada a las 96 hpf.....	39
Tabla 12. Letalidad de extracto metanólico de <i>Otholobium mexicanum</i> registrada a las 96 hpf.	40
Tabla 13. LC50 Determinado a las 96 hpf.	41
Tabla 14. Resultados de teratogenicidad de extracto metanólico de <i>Peperomia</i> sp a las 24 hpf.	44
Tabla 15. Resultados de teratogenicidad de extracto metanólico de <i>Peperomia</i> sp a las 48 hpf.	45
Tabla 16. Resultados de teratogenicidad de extracto metanólico de <i>Peperomia</i> sp a las 72 hpf.	45
Tabla 17. Resultados de teratogenicidad de extracto metanólico de <i>Peperomia</i> sp a las 72 hpf.	46
Tabla 18. Resultados de teratogenicidad de extracto metanólico de <i>Otholobium mexicanum</i> a las 24 hpf.	47
Tabla 19. Resultados de teratogenicidad de extracto metanólico de <i>Otholobium mexicanum</i> a las 48 hpf.	48
Tabla 20. Resultados de teratogenicidad de extracto metanólico de <i>Otholobium mexicanum</i> a las 72 hpf.	49
Tabla 21. Resultados de teratogenicidad de extracto metanólico de <i>Otholobium mexicanum</i> a las 96 hpf.	50

ABREVIATURAS

AC	Acumulación de sangre
CE	Coagulación del Embrión
DMSO	Dimetil sulfóxido
EP	Edema Pericárdico
FET	Fish embryo acute toxicity
hpf	Horas post fertilización
LC ₅₀	Concentración letal 50
LOEC	Concentración del efecto más bajo
MC	Malformación de cola
MCO	Malformación de columna
MY	Malformación de yema
NOEC	Concentración a la que no se observa efecto
OCDE	Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico
RC	Retardo general del crecimiento

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, por ser mi motor y fortaleza a lo largo de este arduo camino. Sin la fe que me ha otorgado este logro no habría sido posible, gracias por brindarme la valentía para enfrentar los desafíos y la perseverancia para seguir adelante incluso en los momentos más difíciles.

A mi madre, que me ha sabido guiar y llenarme de aliento para jamás decaer. Eres la mujer más fuerte y valiente que conozco, me has enseñado el verdadero significado del amor incondicional, la humildad y generosidad, este trabajo es en honor a ti.

A mi padre, gracias por tu sacrificio y esfuerzo para brindarme las mejores oportunidades en la vida.

A mis queridos hermanos, Esteban, Daniel y en especial María José, gracias por siempre creer en mí, incluso cuando yo misma dudaba.

A mi novio, Jorge, mi compañero fiel, tus palabras de amor, aliento, admiración, paciencia y comprensión fueron un pilar para completar esta meta. Cada paso en este camino fue significativo porque tú estás a mi lado, celebrando mis éxitos y sosteniéndome fuerte cuando las cosas se complican.

A mi compañera de tesis, Odalys, por enfrentar juntas este desafío.

Paola Espinoza C.

Dedico esta tesis a mi familia, en especial a mi padre por ser mi apoyo incondicional durante toda mi vida, siempre me has permitido soñar en grande y me has ayudado a tener la confianza de que puedo lograr todo lo que me proponga. A mi madre, por su apoyo a pesar de la distancia.

A mi hermana, Andrea por enseñarme a ver lo bonito en mí misma, en la vida y a darme cuenta de que nada es tan malo como parece. A mi hermano Raúl por nunca dejarme sola cuando lo necesite y acompañarme en mi camino. A mi tía Marcela por cuidar de mí, por tenderme su mano y enseñarme lo fuerte que puedo llegar a ser. A Geovanna por estar a mi lado desde niña, cuidarme y buscar que siempre sea la mejor versión de mí misma.

A mis abuelitos: Olmedo, Carmen, Luz, José (†), Trajano (†) y Bertha por darme un ejemplo a seguir y por sus palabras de aliento que me levantaron el ánimo más de una vez. Olmedo y Carmen, gracias por siempre estar en cada uno de mis pasos, por enseñarme a ser responsable e independiente y siempre decirme que soy capaz de todo.

A Paola mi compañera de tesis, sin ti esto no sería posible.

Finalmente, a mis amigos: Daniela, Pablo, Bryan y Nayeli, por apoyarme en los días difíciles cuando creía todo perdido, por ser mi ancla con la realidad y nunca dejar que me dé por vencida, ustedes tomaron mi mano y me ayudaron a llegar donde estoy en todos los ámbitos: mental, emocional y académico.

Odalys Heredia A.

AGRADECIMIENTO

Queremos expresar nuestra más sincera gratitud a todas las personas que contribuyeron en la elaboración de este proyecto e hicieron posible que esta meta académica se convierta en una realidad.

Primeramente, deseamos expresar nuestros más profundos agradecimientos a tan prestigiada institución como es la Universidad de Cuenca. A nuestra querida Facultad de Ciencias Químicas, por brindarnos un espacio para poder desarrollar nuestro conocimiento y habilidades, gracias a la excelente formación académica y profesional. Agradecemos de forma especial a nuestros docentes, quienes se convirtieron en grandes fuentes de sabiduría e inspiración, gracias a sus enseñanzas y orientación nos logramos formar como profesionales.

Agradecemos al equipo que forma parte del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca, por brindarnos la apertura y depositar su confianza en el desarrollo de este proyecto, además de, brindarnos su apoyo en cada paso que se realizó.

Un total agradecimiento a nuestra guía y tutora, Dra. Eugenia Peñaherrera, por su apoyo, orientación y paciencia a lo largo de este proceso. Su formación académica y sus conocimientos fueron valiosas herramientas para dar rienda a este proyecto.

Una mención especial para la Dra. Jessica Calle, que desde un inicio nos brindó su amable apertura, nos orientó y nos supo guiar en cada situación que presentamos dificultades.

Finalmente, agradecemos a nuestros queridos amigos y compañeros de carrera, por siempre brindarnos palabras de aliento y motivación.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los medicamentos herbarios abarcan hierbas, preparaciones y productos, que contienen como principios activos partes de plantas, ya sean flores, tallos, hojas o raíces o la combinación de estos. Las especies vegetales, desde tiempos inmemorables han destacado por su uso terapéutico, empleadas para el cuidado de la salud de millones de familias en diversas partes del mundo, sin embargo, es importante señalar que el consumo indiscriminado de las mismas puede tener riesgos, principalmente causado por la falta de una evaluación precisa de las dosis adecuadas y los posibles efectos adversos en la salud. Estos riesgos pueden incluir la posibilidad de intoxicación o, en casos extremos, la inducción de teratogenicidad. No obstante, es fundamental destacar que la responsabilidad no recae necesariamente en las plantas, sino en la falta de información y cuidado en su uso, así como en la necesidad de investigación y orientación adecuadas para garantizar un uso racional.

Desde hace décadas la práctica de la medicina tradicional ha contribuido a la prevención y restauración de la salud humana, tanto es así que, la OMS ha renovado sus estrategias sobre la medicina tradicional hasta el 2023 con los objetivos de, primero, aprovechar la contribución de la medicina tradicional para influir en los sistemas de salud, específicamente, en la atención primaria y segundo, promover la utilización de la misma a través de proyectos de investigación (Bermúdez del Sol et al., 2022).

En Ecuador, la planta medicinal conocida como Congona (*Peperomia sp*) es ampliamente utilizada a través de infusiones y macerados de sus tallos, hojas y raíces (Rivero-Guerra, 2021). Estos preparados se emplean en forma de cataplasmas o emplastos para tratar diversas afecciones, como el asma, la tos, las úlceras y la conjuntivitis. Además, se ha demostrado que poseen propiedades diuréticas, analgésicas y antibióticas (de Moraes & Kato, 2021).

Por otro lado, la planta medicinal conocida como Trinitaria (*Otholobium mexicanum*) se emplea a través de infusiones preparadas con sus tallos y hojas (Rivero-Guerra, 2021). Esta planta es reconocida por sus propiedades digestivas y se emplea principalmente como laxante o para aliviar síntomas de indigestión, infecciones intestinales y flatulencia (Armijos et al., 2018; Jerves-Andrade et al., 2014). Además, los estudios realizados por Armijos y colaboradores en 2018 destacan que la Trinitaria posee diversas propiedades medicinales adicionales, como su efecto antidiabético, astringente, balsámico, hemostático y carminativo.

El análisis de diferentes compuestos y su toxicidad tiene un papel importante, pues ayuda a enriquecer el conocimiento actual y será la base para futuras investigaciones.

La importancia de la determinación de la toxicidad de plantas medicinales repercute principalmente en la seguridad de las personas que las consumen de forma indiscriminada; así muchas personas de comunidades rurales con poco acceso a sistemas de salud e incluso la población dentro de la ciudad, hace uso inadecuado de plantas medicinales, debido a su conocimiento empírico. Por otro lado, el análisis de la toxicidad puede realizarse en diferentes especies, cabe mencionar que los modelos de experimentación animal, han cambiado a lo largo de los años y siempre se busca una forma de minimizar el impacto ético en los modelos *in vivo* (Andersen & Winter, 2019).

El pez cebra (*Danio rerio*) se utiliza como modelo embrionario y larval para la experimentación *in vitro* y estudios de toxicidad de alto rendimiento, gracias a sus óptimos resultados que se pueden aplicar hacia la salud humana, por la gran similitud de los datos de peces y humanos, que muestran una morfología y fisiología similares de los sistemas nervioso, cardiovascular y digestivo. Por estas razones, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) ha establecido y aprobado pruebas específicas para evaluar la toxicidad durante el desarrollo del pez cebra, dichas pruebas van desde la evaluación de la toxicidad de compuestos bioactivos o extractos crudos de plantas hasta la determinación del proceso óptimo (OCDE, 2013). Además, este modelo embrionario emplea las Directrices 3R, que son principios establecidos con la finalidad de buscar el bienestar de los animales empleados en investigación (Stokes, 2015). Las 3R se definen como reemplazo, reducción y refinamiento al aplicar estas directrices se pretende impulsar el uso de animales de investigación de una forma ética y proporcionar la educación necesaria para que esto sea posible (Törnqvist et al., 2014). En el caso del pez cebra, se reemplaza a otros animales de experimentación al trabajar con las larvas, siempre y cuando el modelo y protocolo de investigación sea validado previamente (Chahardehi et al., 2020). Se logra reducción, al permitir ensayos preliminares con los embriones de pez cebra que permitirán probar moléculas iniciales y evidenciar las más seguras para la investigación en modelos de mamíferos; pues al ser un modelo que con pocos animales se disponen de muchos huevos (Cassar et al., 2020; Chahardehi et al., 2020). Además, se aplica, refinamiento, al probar toxicidades de forma no invasiva debido a que, los embriones son fertilizados externamente y son transparentes por lo que la visualización de estructuras es sencilla (Cassar et al., 2020).

Por lo expuesto anteriormente, el propósito central de este estudio radica en evaluación de la toxicidad de los extractos metanólicos de dos plantas medicinales *Peperomia sp* y *Otholobium mexicanum*, empleando los criterios establecidos por la Organización para la

Cooperación y el Desarrollo Económico. Adicionalmente, se llevará a cabo la determinación de la concentración letal 50 (LC_{50}) y la evaluación del potencial teratogénico de los extractos metanólicos de las plantas medicinales antes mencionadas.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. DESCRIPCIÓN DE LAS PLANTAS OBJETO DE ESTUDIO.

1.1.1. *Peperomia* sp.

Nombre común: Congona.

Descripción botánica.

Pertenece a la familia de las Piperáceas, crecen en climas tropicales, subtropicales y templados; es una planta herbácea generalmente de cultivo ornamental, que puede o no tener glándulas aromáticas. Presenta hojas alternas o verticiladas, carnosas y coloreadas variadamente, frecuentemente de pecíolo largo, elípticas, ovaladas o hasta en forma de corazón, dependiendo del medio en donde se desarrolle puede alcanzar una altura entre los 10 a 50 cm, tallo cilíndrico, con ramificaciones en la base y nudos inferiores (Ponce Cobos, 2019)

Descripción de hábitat.

Es una planta terrestre que se encuentra entre los 2600 a 4000 msnm, se desarrolla en lugares húmedos y semisombreados y se encuentra distribuido en países como Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú (Guillermo et al., 2005).

Usos tradicionales.

Suele emplearse para el tratamiento del asma, la tos, las úlceras, la conjuntivitis, la inflamación y se ha demostrado que funcionan como diurético, analgésico y antibiótico (de Moraes & Kato, 2021). En lo que respecta a los extractos crudos y productos naturales aislados de especies del género *Peperomia* se ha evidenciado que posee actividades biológicas como citotóxico, antifúngico, insecticida y propiedades tripanocidas (de Moraes & Kato, 2021). En contraste, los extractos de *P. pellucida* exhiben actividad analgésica, antiinflamatoria, antipirético, antioxidante, antihiperuricémico, antihiperglucemiante, gastroprotector, antiosteoporótico, inmunoestimulante, neutralización de radicales libres y antimicrobiano (Huang et al., 2022).

Compuestos bioactivos.

La actividad biológica de varios compuestos indica su potencial como antiparasitario, antibacteriano, citotóxico contra diversas cepas tumorales y herbicidas. Ware y colaboradores menciona que algunos compuestos presentes en especies como *P. pellucida*, *P. doclouxii*, *P.*

dindygulensis y *P. blanda* exhiben efectos citotóxicos (2022). Los metabolitos secundarios extraídos de su familia se describen como policétidos, meroterpenos, cromenos, fenilpropanoides, lignanos, amidas y secolignanos a base de ácido orsellínico (Gutierrez et al., 2016). Además Ooka y colaboradores 2022, indican que la especie de *Peperomia* representa una importante fuente de policétidos como 2-aciciclohexano-1,3-diones, alatanona y trineurona, que presentan roles favorables como propiedades farmacológicas contra varias líneas celulares cancerígenas, así como actividades antimicóticas y antimicrobianas. En cuanto a la composición química del aceite esencial de Moraes & Kato, 2021, indican que tras un estudio de las hojas de *P. pellucida*, los componentes principales son los fenilpropanoides dillapiol y apiol, junto con mono y sesquiterpenos. Un examen más detallado de las raíces de *P. pellucida* reveló que el β -farneseno era el principal componente del aceite esencial (de Moraes & Kato, 2021).

Figura 1. Congona, *Peperomia* sp.



1.1.2. *Otholobium mexicanum*.

Nombre común: Trinitaria, Canchila y Huallua.

Descripción botánica.

Pertenece a la familia Fabaceae, es un arbusto ramificado, pubescente que puede medir hasta 2,5 m de alto. Sus hojas son alternas, trifoliadas, cada foliolo es lanceolado, acuminado, de bordes enteros, tiene un haz brillante y envés claro. Inflorescencia puede tener espigas axilares o terminales cuyo color varía entre lila a azul (Oleas et al., 2016).

Descripción de hábitat.

Se encuentra distribuido en países como Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú, a un rango altitudinal de 1500–4000 msnm (Oleas et al., 2016).

Usos tradicionales.

Es considerada una planta medicinal, sus hojas son empleadas para preparar té refrescante y la infusión de sus tallos es usada para el malestar estomacal causado por una infección bacteriana (Graf et al., 2016). Ancestralmente también es empleada como anticonceptivo, indigestiones, dolor estomacal, acidez estomacal, afecciones postparto y para eliminar garrapatas de ovejas (Graf et al., 2016; Kittipaspallop et al., 2019).

Compuestos bioactivos.

Se han podido extraer diferentes moléculas del extracto metanólico de *Otholobium mexicanum* entre estos destacan: bakuchiol, el hidroxibakuchiol, la daidzina y la genistina (Armijos et al., 2018).

Figura 2. *Otholobium mexicanum*.



1.2. MODELO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN DE PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*).

El pez cebra (*Danio rerio*), es miembro de la familia de los ciprínidos, un pez teleósteo ovíparo, y una especie tropical de agua dulce originaria del sur de Asia, y se distribuye ampliamente en partes de India, Bangladesh, Nepal, Myanmar y Pakistán (McCluskey & Braasch, 2019).

De acuerdo McCluskey & Braas (2019) el pez cebra presenta la siguiente taxonomía:

Tabla 1. Taxonomía del Pez cebra.

Reino	<i>Metazoa (Animalia)</i>
Phylo	<i>Cordita</i>
Subphylum	<i>Vertebrata</i>
Clase	<i>Actinópteros</i>
Orden	<i>Cipriniformes</i>
Familia	<i>Danionidae</i>
Género	<i>Danio</i>
Especie	<i>Danio rerio</i>

El sexo de los peces jóvenes (desarrollo menor a 3 meses) no se puede distinguir de manera confiable sin una disección. Las hembras se diferencian de los machos por presentar una forma corporal más redondeada, siendo la característica diagnóstica más confiable, la presencia de una pequeña papila genital frente al origen de la aleta anal. Los machos tienen un cuerpo más delgado con líneas azules longitudinales más pronunciadas y tienen una coloración más amarilla en la aleta anal. El patrón de color comprende tres tipos de células de pigmento, melanóforos de color azul oscuro, xantóforos dorados e iridóforos iridiscentes. En general, un pez cebra adulto suele tener menos de 5 cm de longitud, su forma corporal es fusiforme y comprimida lateralmente, con una boca oblicua terminal dirigida hacia arriba (Gonçalves Reis, 2022).

Figura 3. Pez cebra adulto.



Imagen tomada de Gonçalves Reis, 2022.

El modelo de pez cebra científicamente conocido como *Danio rerio*, es un modelo animal ampliamente usado para el desarrollo genético, transgénico y estudios toxicológicos, en breves rasgo el amplio uso de embriones de pez cebra se atribuye principalmente a la alta conservación de genes en función entre el pez cebra y los humanos (Bauer et al., 2021).

Una comparación del genoma de referencia humano con el genoma del pez cebra revela aproximadamente el 70 % de los genes humanos tienen ortólogos en los genes de pez cebra (García et al., 2016).

Figura 4. Usos del pez cebra en modelos de enfermedades.

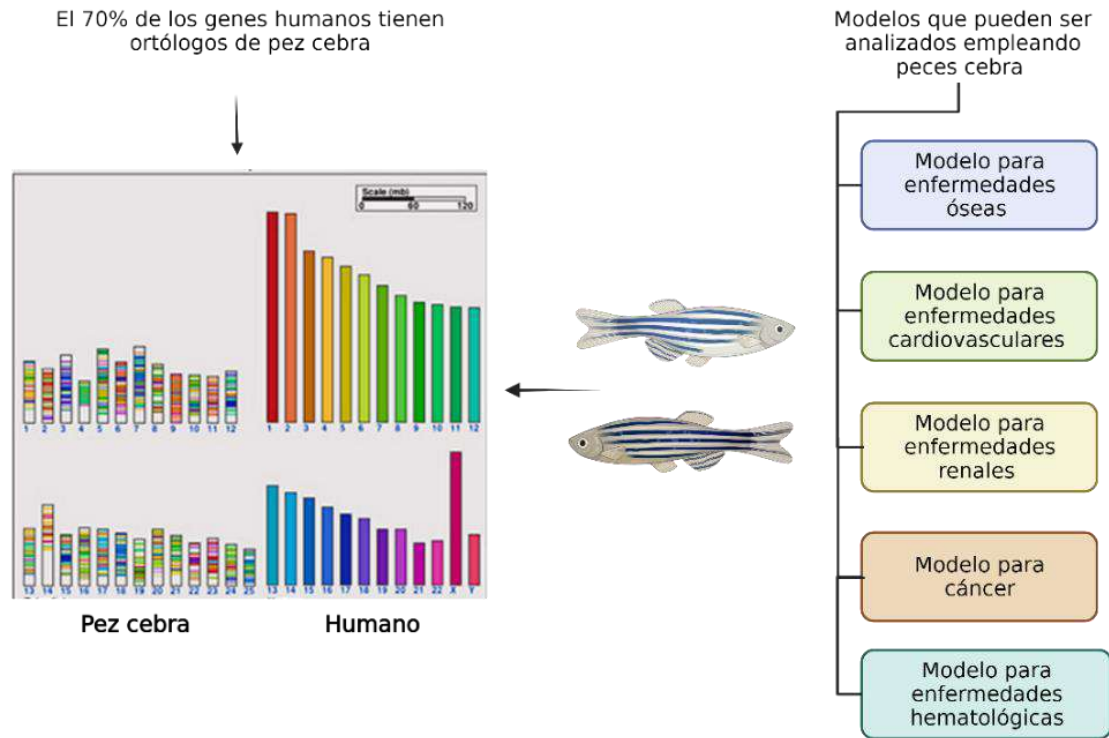


Imagen modificada de Adhish & Manjubala, 2023.

El pez cebra comparte numerosas características con el sistema nervioso de los mamíferos. Estas similitudes abarcan tanto las estructuras como los sistemas de neurotransmisores, como el GABA, glutamato, dopamina, serotonina, noradrenalina, histamina y acetilcolina. Además, los datos disponibles, indican que la expresión de genes que regulan la función de los neurotransmisores en el pez cebra es similar a la observada en modelos de roedores utilizados en la investigación de mamíferos; y a nivel molecular, se han identificado características anatómicas compartidas a nivel amplio, tales como la presencia del cerebelo, telencéfalo, diencefalo, médula espinal y sistema nervioso entérico-autonómico (García et al., 2016).

A continuación, se expone una tabla comparativa de las primeras etapas de desarrollo de la vida humana y el pez cebra:

Tabla 2. Etapas de desarrollo de pez cebra y su correlación con el ser humano (García et al., 2016)

Etapas de desarrollo	Día humano (día)	Pez cebra (hora)
----------------------	------------------	------------------

Blástula / Blastocisto	4 – 6	2 – 5
Formación de placas neuronales	17 – 19	10
Primera somita	19 – 21	10 – 11
10 etapa somita	22 – 23	14
Formación de tubos neuronales	22 – 30	18 – 19
Primer arco faríngeo	22 – 23	24
Iniciación de la organogénesis	21	10
Primer latido	22	24
Nacimiento / eclosión	253	48 – 72

A su vez, cabe mencionar una diferenciación entre modelos animales como son los ratones, que como se observa en la Figura 5, el modelo del pez cebra comparte más similitudes en el desarrollo embrionario frente al humano.

Figura 5. Similitudes en el desarrollo de Humanos, ratas y peces cebra.

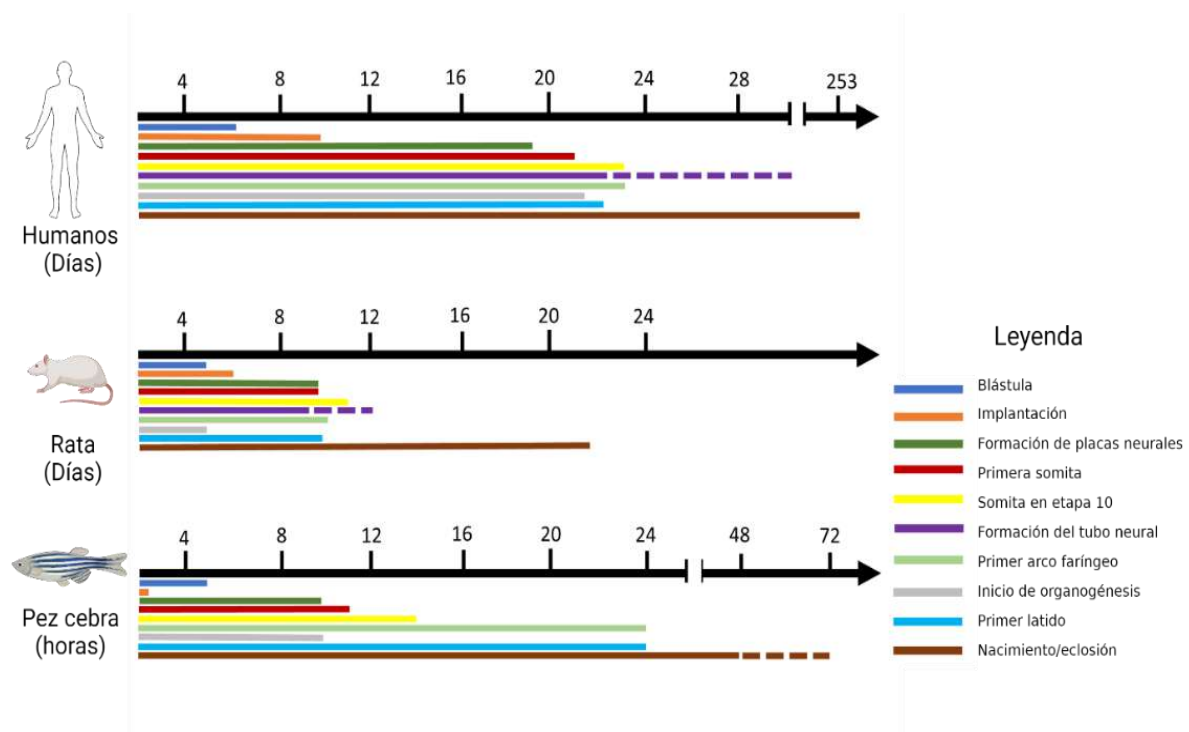


Imagen modificada de (Chahardehi et al., 2020).

En general, tanto los adultos como los embriones del pez cebra se utilizan como modelos de experimentación, sin embargo, las etapas del embrión son empleadas en las evaluaciones toxicológicas particularmente debido a la naturaleza transparente del huevo que permite la observación directa de las etapas de desarrollo y evaluación de punto final en toxicidad, y adicional, la gran cantidad de embriones disponibles para las evaluaciones; lo cual es característico del proceso de embriogénesis, en donde cada hembra puede poner 100 – 200 óvulos fertilizados externamente (Jayasinghe & Jayawardena, 2019). Como se observa en la Tabla 3, según Kimmel et al., 1995, las principales etapas del desarrollo del pez cebra que permiten evaluar el potencial de toxicidad en un extracto corresponde a:

Tabla 3. Principales etapas de desarrollo de pez cebra.

Periodo	Tiempo (hpf)	Características principales
Cigoto	0 horas	Transcurrido 40 minutos post fertilización se produce la primera división. El cigoto mide unos 0,7 mm de diámetro en el momento de la fecundación, se puede encontrar una etapa unicelular (0 h). El corion se hincha y se separa del óvulo recién fecundado, la fecundación también activa los movimientos citoplasmáticos, que se manifiestan fácilmente en unos 10 minutos. Los embriones de pez cebra se encuentran protegidos por un corion hasta 2 o 3 dpf. El corión es una envoltura acelular que contiene poros de aproximadamente 0.5 μm de diámetro y 2 μm de espacio, con químiopermeabilidad.
Periodo Clivaje	0,7-2.2	Etapas de división celular, las células embrionarias, también conocidas como blastómeros, se separan cada 15 minutos. Este tipo de división se denomina meroblástica.
Periodo Blástula	2,15-5,15	Periodo en el que el blastodisco empieza a tener aspecto de bola, corresponde al estadio de 128 células y dura hasta el momento del inicio de la gastrulación, además comienza la epibolia.

Periodo Gástrula	5,15-10	Se caracteriza por presentar movimientos morfogénéticos de involución, convergencia y extensión, forman el epiblasto, el hipoblasto y el eje embrionario; hasta el final de la epibolia.
Segmentación	10-24	Se genera el desarrollo de somitas, primordios del arco faríngeo y neurómeros; caracterizada por organogénesis primaria; primeros movimientos y aparición de la cola
Periodo Faríngrula	24-48-72	El embrión se encuentra en etapa filotípica; el eje del cuerpo se endereza desde su curvatura inicial sobre el saco vitelino; además, la circulación, la pigmentación y las aletas comienzan a desarrollarse
Periodo de Eclosión	72 aproximadamente	Periodo caracterizado por la finalización de la morfogénesis primaria, se genera el desarrollo del cartílago de la cabeza y pectoral.
Larva Temprana	96	Se caracteriza por una eclosión asíncrona, la vejiga natatoria se infla y además se observan comportamientos de búsqueda de alimentos y evitación activa.

(Kimmel et al., 1995)

Figura 6. Etapas del desarrollo de Pez cebra.

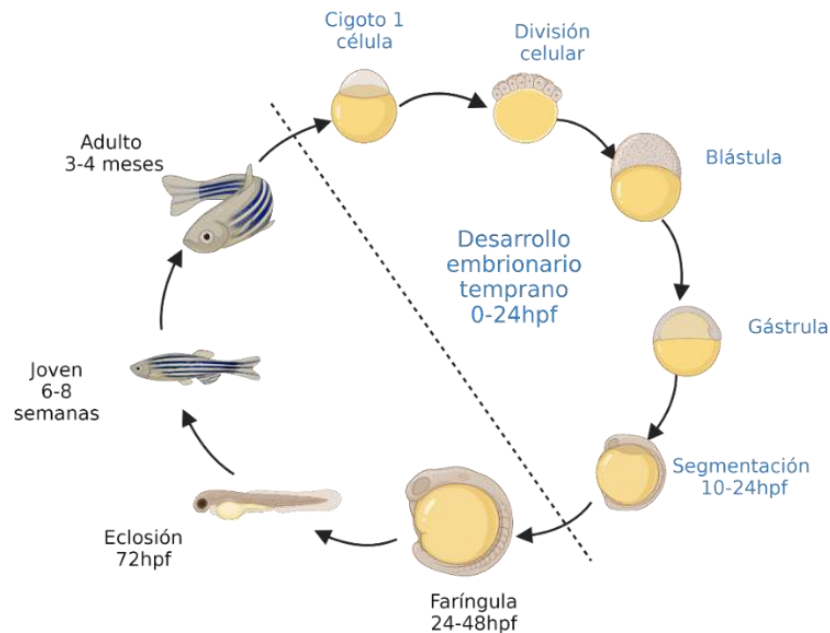


Imagen modificada de D'Costa & Shepherd, 2009.

El desarrollo del pez cebra es muy rápido y ocurre en tan solo 2 a 4 días. De 48 a 72 horas después de la fertilización (hpf), la mayoría de los órganos ya están completamente formados, excepto los del tracto gastrointestinal. No es hasta alrededor de las 76 hpf que el hígado, el páncreas y el intestino logran un desarrollo completo. Finalmente, a las 96 hpf, el tracto gastrointestinal está completamente formado. Aunque los peces cebra jóvenes, muestran la mayoría de las características de los adultos, se vuelven verdaderamente maduros alrededor de los 3 meses de edad, cuando alcanzan la madurez sexual (Bauer et al., 2021).

Las principales ventajas del uso de este modelo radican en el tiempo, costo, facilidades de ensayos y disminución de sufrimiento de animales de investigación (Caballero & Candiracci, 2018). La experimentación con mamíferos requiere de un presupuesto superior debido a que se necesita de áreas más extensas, una mayor capacitación de personal, cuidados más exhaustivos y una mayor cantidad de animales de investigación debido a los tiempos de reproducción (Chahardehi et al., 2020). Al comparar este modelo con roedores, se evidencia que éste es menos costoso y tiene una capacidad de reproducción mayor, pues un par típico de roedores producen de 5 a 10 crías por evento de apareamiento, en contraste el pez cebra produce de 200

a 300 embriones, además, esta reproducción es más controlable. Otro ámbito importante, es el control de condiciones sociales y conductuales naturales lo que reduce el estrés de la vivienda y su posible repercusión en resultados experimentales (García et al., 2016).

Facilidades de estudio, la principal ventaja en este ámbito radica en que se sabe a cabalidad la duración de desarrollo embrionario, lo que permite el estudio en sus primeras etapas de vida y su genoma ha sido completamente secuenciado, por lo que se conoce que tiene homología genética con vertebrados superiores (Bauer et al., 2021; García et al., 2016). En lo que respecta a estudios genéticos, el pez cebra es un modelo fácil de emplear ya que puede absorber mutágenos a partir del agua (García et al., 2016), por otro lado, se pueden inactivar genes *in vivo* lo que permite investigar enfermedades humanas que tengan antecedentes genéticos al realizar edición genómica como CRISPR/Cas9 (Chahardehi et al., 2020). En el ámbito de toxicidad el pez cebra tiene el potencial de revelar las vías de toxicidad del desarrollo debido a su similitud con las de los mamíferos (Caballero & Candiracci, 2018).

A pesar de que existen múltiples ventajas en este modelo, también existen ciertas limitaciones que deben ser consideradas durante la planificación de una investigación para evaluar si éstas no influyen en los resultados deseados. Los peces cebra no tienen cromosomas sexuales por lo que hay una diferencia en la proporción de sexo y se puede dar un dimorfismo sexual. Una segunda limitación radica en la administración de fármacos o principios activos insolubles, pues, el modelo se basa en la administración de principios activos por difusión del medio donde se encuentran los peces, en caso de estos principios activos se debe aplicar otros mecanismos de administración como microinyecciones a través del esófago, por ejemplo. Otra limitación se evidencia en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica debido a que los peces cebra si poseen ésta, sin embargo, su permeabilidad es diferente a la de los seres humanos por lo que los estudios de fármacos deberán considerar esta diferencia (Adhish & Manjubala, 2023).

1.3. PRINCIPIOS DE TOXICIDAD AGUDA.

1.3.1. Toxicidad Letal Aguda.

La toxicidad aguda es la capacidad que tiene una sustancia de causar daño después de una exposición, este daño se verá con la presencia de síntomas en un rango de tiempo corto (horas a días). La toxicidad aguda se expresa en función de la concentración letal 50 (Gobernacion Chacabuco, 2007).

Los estudios de toxicidad aguda son un paso importante para la evaluación del potencial toxicológico de una sustancia. Por otro lado los resultados recabados pueden: brindar

información inicial sobre la acción tóxica de una sustancia, ser la base para determinar la dosis tóxica y terapéutica de un nuevo compuesto y la determinación de los valores de DL_{50} (Akhila et al., 2007).

1.3.2. Toxicidad Aguda según Documento 236.

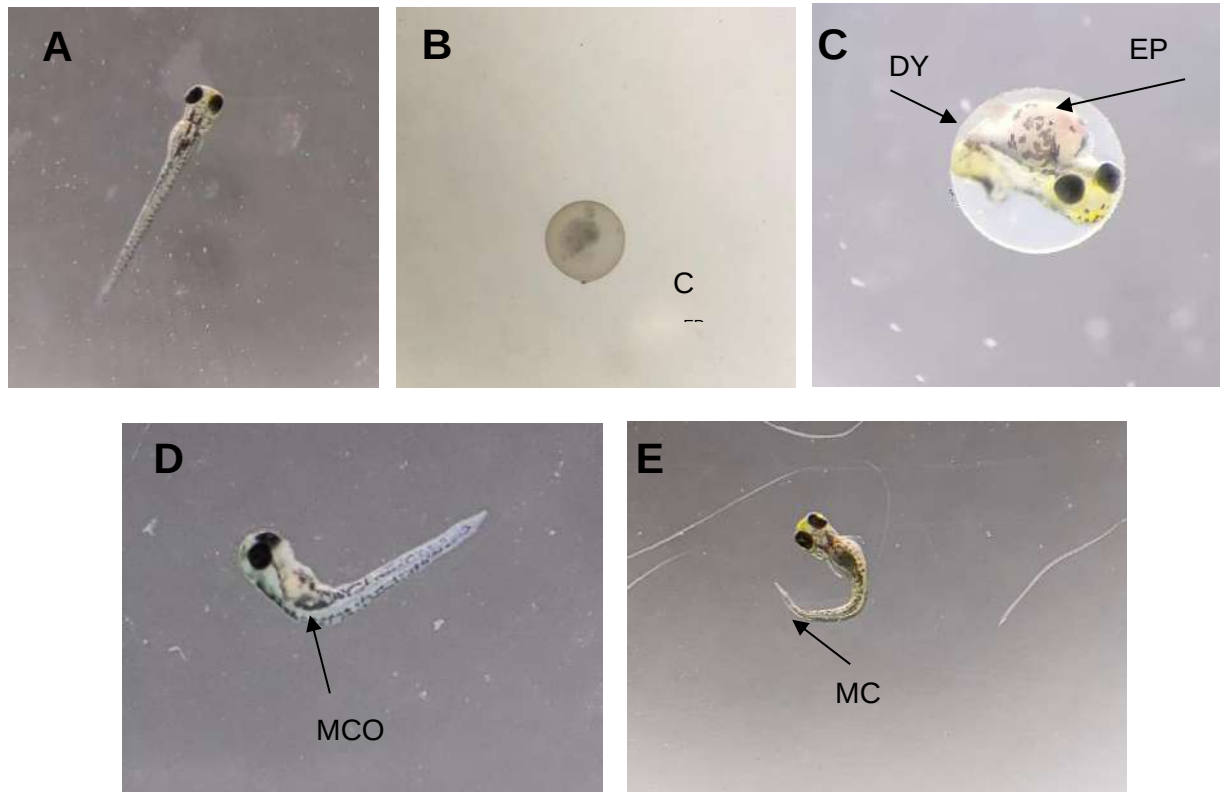
Los embriones de pez cebra se exponen individualmente en placas de 24 pocillos a una serie de concentraciones de la sustancia de ensayo. El ensayo se inicia inmediatamente después de la fecundación y se prolonga durante 48 horas. Los efectos letales, descritos por cuatro puntos finales apicales, se determinan por comparación con controles para identificar los valores LC_{50} , NOEC y LOEC. El método de ensayo se basa en el uso de un mínimo de cinco concentraciones de ensayo, así como controles apropiados, con diez embriones individuales por concentración de exposición. Cada sustancia debe ensayarse en paralelo en dos o tres réplicas independientes (OECD, 2013).

Criterios evaluados:

- a) **Coagulación del embrión:** los embriones coagulados son de color blanco lechoso y aparecen oscuros al microscopio (OECD, 2013). La coagulación es un criterio para evaluar la toxicidad aguda y se genera debido a que: se reduce el flujo sanguíneo, se da un retraso en el desarrollo y se detiene la gastrulación (Ruffieux, 2020).
- b) **Malformación de cola:** cuando se da un desarrollo normal se observa el desprendimiento de la cola de la yema a partir de las 24 hpf.
- c) **Malformación de columna:** la malformación de columna es una flexión en la columna vertebral del pez cebra, aparecen debido a una ruptura de la columna la cual genera una curvatura fácilmente evidenciable. Esta malformación podría diferenciarse entre lordosis, escoliosis y cifosis (von Hellfeld et al., 2020).
- d) **Deformación de la yema:** es un criterio de evaluación de teratogenicidad debido a que la yema puede agregar selectivamente xenobióticos lipofílicos del ambiente acuático circundante a los embriones. La yema está compuesta en su mayoría por proteínas y los lípidos: colesterol (40 %), fosfatidilcolina (17 %) y triglicéridos (9 %) (Sant & Timme-Laragy, 2018).
- e) **Edema pericárdico:** es la acumulación de líquido alrededor del corazón, en modelos de experimentación animal con peces suelen desarrollarse después de la exposición de los embriones a sustancias químicas. Existen estudios que indican que el edema pericárdico en embriones de peces cebra puede deberse a insuficiencia renal, insuficiencia

circulatoria, desequilibrio iónico y defectos de permeabilidad y respuesta al estrés (Wiegand et al., 2023).

Figura 7. Criterios de teratogenicidad.



Nota. A. Larva de pez cebra normal. B. Coagulación del embrión (C). C. Edema pericárdico (EP) y malformación de yema (DY). D. Malformación de columna (MCO). E. Malformación de cola (MC).

1.3.3. Concentración Letal 50.

La LC_{50} (del inglés Lethal concentration 50) es la cantidad de una sustancia que causa la muerte del 50 % de animales de experimentación usados en una prueba. En las pruebas farmacológicas la determinación de la LC_{50} es el paso inicial para la valoración de las características toxicológicas de una sustancia, este primer acercamiento a la toxicidad de una sustancia genera información preliminar sobre los posibles efectos tóxicos que podrían surgir tras el uso prolongado de un medicamento (Akhila et al., 2007). Un valor inferior de LC_{50} indica una mayor toxicidad aguda (Fernández, 2016).

1.3.4. Teratogenicidad.

Se refiere a cualquier alteración morfológica, bioquímica o funcional, causada por agentes genéticos y ambientales que se genera durante el desarrollo embrionario y puede ser detectada en la gestación, el nacimiento o cualquier etapa posterior (Rojas Leonart et al., 2015). La

teratogénesis por lo general se genera durante la fase de organogénesis, debido a que en esta fase se da la diferenciación y especialización de tejidos, estructuras, órganos y sistemas. Las alteraciones producidas pueden ser clasificadas según su severidad y tipo de alteración que se ha generado y esto dependerá del tiempo de interacción del agente teratogénico con el embrión/feto y el mecanismo que tiene el agente para causar teratogenicidad. Los principales mecanismos por los que se da la teratogénesis son: el estrés oxidativo, el antagonismo del folato, la disrupción vascular, la disrupción de las células de la cresta neural, la disrupción endocrina y las acciones mediadas por enzimas o receptores específicos (Cassina et al., 2017; Chamorro-Cevallos et al., 2022).

Los ensayos de teratogenicidad en el área farmacéutica, tienen la finalidad de garantizar que un fármaco o principio activo no cause defectos en el nacimiento. Para lograr esto se busca modelar malformaciones humanas empleando un modelo experimental *in vivo* o *in vitro* (Vargesson & Fraga, 2017).

1.4. PROCESOS GENERALES PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES.

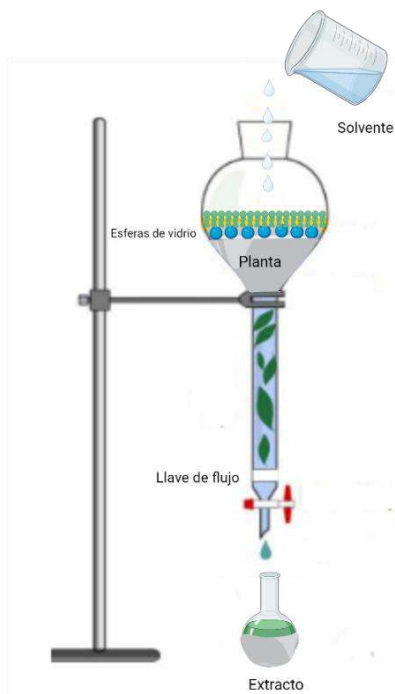
1.4.1. Percolación.

La percolación es una técnica ampliamente empleada para la extracción de principios activos, es el método oficial de extracción, descrito en la Farmacopea Americana, USP. Se fundamenta en la capacidad del menstreo, que generalmente corresponde a un solvente alcohólico o una mezcla hidroalcohólica, para atravesar el material vegetal y lograr la extracción total de los principios activos de hasta el 95 % de sustancias extraíbles (Carrion Jara & García Gómez, 2010).

Es el procedimiento más utilizado para la extracción de principios activos en la elaboración de tinturas y extractos fluidos. Se emplea un percolador, que es un recipiente angosto en forma de cono abierto en ambos extremos. En cuanto a su procedimiento, primeramente, con una cantidad adecuada del solvente, se humedece al material vegetal y se deja reposar durante aproximadamente 12 h en un recipiente bien cerrado, después se coloca el material vegetal en el percolador armado y se agrega el menstreo adicional para formar una capa poco profunda por encima de la masa, se deja macerar en el percolador cerrado durante 24 horas (*Fig. 8*). A continuación, se abre la salida del percolador y se deja que el líquido contenido en ella gotee lentamente hasta regular un flujo constante. Se agrega el menstreo adicional según sea necesario, hasta que el filtrado mida aproximadamente tres cuartas partes del volumen requerido

del producto terminado, posteriormente se agrega suficiente menstruo para obtener un líquido clarificado por filtración obteniendo finalmente un agotamiento total de la droga.

Figura 8. Esquema general de percolación.



1.4.2. Liofilización.

La liofilización es un método de secado donde el objetivo es eliminar el agua del material congelado utilizando el proceso de sublimación de hielo. La calidad del material seco obtenido es mucho mayor que en otros métodos de secado. En general, este proceso elimina el agua de un material mediante sublimación (transición de sólido a gas que pasa por alto la fase líquida). Se lleva a cabo en condiciones negativas de temperatura y presión significativamente reducida (1 – 50 Pa). El primer paso crucial en este proceso es la congelación a una temperatura de -40°C a -50°C y es relativamente de corta duración para evitar la formación de grandes cristales de hielo, el siguiente paso se emplea una combinación de vacío y temperatura. Este procedimiento permite la eliminación de hasta el 95 % del agua y puede tomar hasta 2 días. La última etapa es el secado, llamado desorción, que ocurre a $40 - 50^{\circ}\text{C}$. Su propósito es eliminar el agua fuertemente unida (químicamente) que no se ha congelado y permanece en el material seco. Como resultado, solo queda 1 – 2 % de agua en el material liofilizado (Krakowska-Sieprawska et al., 2022).

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Materiales y equipos.

Metanol ($\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich, Merck Alemania), Dimetil sulfóxido (DMSO, $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Merck, Alemania), Medio de Disolución Danieau's 10x (Hepes $\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich Merck Alemania, Cloruro de potasio, 99.0 – 100.5%, Sigma-Aldrich Merck Alemania, Nitrato de calcio tetrahidratado 99 % %, Sigma-Aldrich Merck Alemania, Cloruro de sodio Merck Alemania), extractos metanólicos de *Peperomia sp* y *Otholobium mexicanum*.

Los reactivos y equipos utilizados se mencionan en cada procedimiento y adicionalmente se encuentran detallados en el Anexo 1.

2.2. Tipo de diseño: Experimental.

2.3. Áreas de recolección y obtención de las muestras.

Las plantas fueron recolectadas en la provincia del Azuay en las coordenadas indicadas en la Tabla 5 y 6 por zonas montañosas aledañas al camino viejo a Girón. La zona de recolección corresponde a una montaña de tipo bosque con un bioclima pluvial-húmedo, con una variación altitudinal de 1660-2200 msnm. La recolección se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección de plantas medicinales (2003).

2.3.1. Recolección de plantas medicinales.

Tabla 4. Coordenadas de recolección de muestra botánica *Peperomia sp*.

Lugar de recolección	Coordenadas		Fecha de recolección
	UTMX	UTMY	
Camino viejo a Girón	708742,10	9655509,50	03/03/2023
Camino viejo a Girón	708711,30	9655509,60	03/03/2023

Tabla 5. Coordenadas de recolección de muestra botánica *Otholobium mexicanum*.

Lugar de recolección	Coordenadas		Fecha de recolección
	UTMX	UTMY	
Camino viejo a Girón	708834,80	9655509,40	03/03/2023

2.3.2. Recolección y preparación de la muestra vegetal.

Las muestras botánicas se encontraron distribuidas en las zonas montañosas colindantes al camino viejo de Girón en la provincia del Azuay. La muestra correspondiente a *Peperomia sp* se encontró en la ladera de la montaña en una zona lodosa e irrigada por un pequeño riachuelo, mientras que la muestra de *Otholobium mexicanum*, se encontró en el pie de la montaña en una zona arbustiva, ambos especímenes se recolectaron manualmente, podando la planta de forma vertical, evitando su destrucción; en el caso de *Peperomia sp* se recolectaron partes aéreas que incluyeran tallos delgados, hojas y flores y para *Otholobium mexicanum* tallo y hojas.

En el laboratorio de Plantas Medicinales del departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca, se realizó la selección de las partes empleadas para la obtención de los extractos de los especímenes recolectados.

Se procedió con el primer lavado bajo agua corriente con el fin de eliminar residuos gruesos (tierra, insectos, etc.) y continuamente se realizó un segundo enjuague con agua destilada por 10 minutos, posterior a esto se colocó las plantas lavadas sobre bandejas recubiertas con papel periódico para que se escurriera durante 20 minutos, una vez escurridas las plantas se colocaron de manera homogénea en las planchas de secado del secador electrónico de plantas Pro-3 (Pro-3, Ecuador), en donde *Otholobium mexicanum* permaneció por aproximadamente 72 horas y *Peperomia sp* durante 120 horas a una temperatura de mínimo 25 °C y máximo 28 °C; con el empleo de una licuadora Oster (Osterizer MOD 4555, Venezuela) se trituraron las partes seleccionadas de cada planta y se almacenaron en bolsas de papel periódico, etiquetándolas de la siguiente manera: ESPINOZA 01 que corresponde a *Peperomia sp* y HEREDIA 01 a *Otholobium mexicanum*, para posteriormente continuar con la extracción metanólica empleando la técnica de percolación.

2.4. Obtención de extractos.

La obtención de los extractos se realizó mediante la técnica de percolación usando como solvente metanol $\geq 99,8\%$ Sigma-Aldrich (Merck Alemania), realizándose de la siguiente manera:

2.4.1. Humectación de la materia vegetal.

Con el empleo de las plantas secas y trituradas, se realizó la humectación con metanol en frascos de vidrio con capacidad de 250 mL durante 15 horas. Para cada planta se pesaron 5 g por duplicado de la materia vegetal y se añadió el solvente de humectación con una cantidad

suficiente que permitió la humedad uniforme de cada extracto, que en el caso de ESPINOZA 01 fueron 4 mL y para HEREDIA 01 6mL, se cubrió con papel aluminio y permanecieron en un lugar seco y protegidos de la luz para evitar la degradación de principios activos.

2.4.2. Percolación de la Materia Vegetal.

Transcurrido el periodo de humectación, se transfirió la droga al equipo de percolación, adicionando el solvente extractivo que corresponde a metanol, asegurándose de que el nivel estuviera 1 cm por encima de la planta, se dejó en maceración durante 24 horas, pasado el tiempo, se comenzó a recolectar las fracciones de los extractos, asegurando un goteo constante de XX gotas por minuto. La primera fracción, llamada fracción 1, se recolectó en un tubo tapa rosca, representando el 75 % del peso inicial de cada planta (7,5 mL). Luego se continuó recolectando una fracción adicional, llamada fracción 2 hasta lograr el agotamiento total.

2.4.3. Concentración del extracto.

Para concentrar los extractos, se empleó un rotavapor Heidolph laborota 4000 Efficient (Schwabach, Alemania) en combinación con un baño María Branson 2510 (Estados Unidos) a una temperatura de 25°C, colocando en el balón del rotavapor volúmenes pequeños de forma consecutiva la fracción 2 de cada extracto, finalmente para extraer el extracto del balón se empleó la fracción 1 y se recogió en un tubo tapa rosca de 25 mL, llamados como tubos concentrados tanto para ESPINOZA 01 como para HEREDIA 01.

2.4.4. Evaporación del extracto con Nitrógeno.

En un baño María Branson 2510 (Estados Unidos) a una temperatura de 25°C, se armó el sistema de evaporación bajo la corriente de N₂ (CAS. 7727-37-9, Cuenca- Ecuador) que consistió en dos soportes universales armados con el fin de suministrar a través de mangueras la corriente de N₂, con el empleo de pinzas de soporte se colocaron los tubos concentrados dirigiendo el flujo de N₂ de manera vertical hasta lograr la evaporación completa del solvente, obteniendo 2 tubos de los extractos concentrados denominados como tubos con extracto concentrado ESPINOZA 01 y HEREDIA 01.

2.4.5. Liofilización de los extractos concentrados.

Se transfirió con una espátula metálica el contenido de los tubos con extracto concentrado a los tubos de liofilización, mismos que se congelaron a una temperatura -80°C hasta lograr la formación de una fina capa homogénea del extracto dentro de los tubos de liofilización, posterior a esto se colocaron los tubos en el Liofilizador LABCONCO No. 7670520 (Estados Unidos) durante 24 horas, finalizado el proceso de liofilización se pesaron 5 viales de 5 mg y 5 viales de

10 mg para ESPINOZA 01 y HEREDIA 01, respectivamente. Una vez pesados y etiquetados correctamente se almacenaron a -80°C en un Bio freezer (No Serie 0145903101140804).

2.5. Evaluación de toxicidad con el modelo *Danio rerio*.

La evaluación toxicológica se basó en la metodología del documento número 236 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), denominada “Prueba de Toxicidad aguda en embriones de pez cebra FET (Fish Embriotoxicity Test)”. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado. Antes de iniciar la prueba se validaron los siguientes criterios:

Tabla 6. Criterios de validación de prueba FET OECD, 2013.

Criterios de Validación	
Tasa de fertilización de los embriones seleccionados	$\geq 70 \%$
Temperatura del agua en las cámaras de prueba en cualquier momento	$26 \pm 1^{\circ}\text{C}$
Supervivencia global de los embriones en el control negativo	$\geq 90 \%$ hasta el final de las 96 horas de exposición
Supervivencia global de los embriones en el control del disolvente	$\geq 90 \%$ hasta el final de las 96 horas de exposición
Exposición al control positivo (DMSO)	Mortalidad mínima del 30% al final de las 96 horas de exposición
Tasa de eclosión en el control negativo	$\geq 80 \%$ al final de las 96 horas de exposición

2.5.1. Preparación del medio de disolución.

Se empleó Danieau's 10x, preparado a partir de 10 mL de una solución de Danieau's 30x + 20 μL de azul de metileno en 990 mL de agua destilada.

2.5.2. Recolección y calidad de huevos.

Se colocaron las trampas en las peceras al finalizar el día alrededor de las 6pm para completar un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, transcurrido este tiempo, se sacaban las trampas y cuidadosamente se aplicaba un enjuague en un cernidor con el medio de disolución Danieau's 10x con la finalidad de eliminar impurezas, finalmente se colocaban los embriones en una caja Petri con medio de disolución.

2.5.3. Selección de los embriones.

Asegurando una temperatura mínima de 24-26°C, se examinaba la caja Petri que contenía los embriones bajo el estereomicroscopio (OLYMPUS, SZX2-ILLT, Japón), observado sus características morfológicas y seleccionando los huevos viables, separándolos de los huevos defectuosos considerados como no viables, que se caracterizaban generalmente por presentar un desarrollo anormal o coagulación, en conjunto, se realizaba un conteo de los mismos para calcular el rendimiento del ensayo el cual debe corresponder una viabilidad de los embriones ≥ 70 %.

2.5.4. Preparación de los controles.

- Control interno/ Control negativo: se empleó Danieau's 10x.
- Control positivo: corresponde a una concentración de 5 % de Dimetil Sulfóxido (DMSO). Se preparó a partir de Dimetil Sulfóxido (DMSO SIGMA-ALDRICH $\geq 99,9$ %) de la siguiente manera: 2250 μL de DMSO y se diluyó en 42,750 μL de Danieau's 10x.
- Control de solvente: se empleó como solvente el Dimetil Sulfóxido (DMSO SIGMA-ALDRICH) en una concentración de 0,1 %, de la siguiente manera: 45 μL de DMSO en 44,955 μL de Danieau's 10x.
- Preparación de las soluciones de prueba de los extractos: se preparó la solución inicial o madre que equivale a una concentración de 10 % de DMSO. El cálculo de la solución inicial y de las concentraciones de prueba se realizaron en base a soluciones sucesivas. Para la solución inicial o madre se procedió a pesar en la balanza analítica (BOECO XX43-0035, Germany) 2,5 mg del extracto, que se diluyó en 100 μL de DMSO y 900 μL de Danieau's 10x. A partir de esta solución se prepararon las 5 concentraciones de prueba como se indican en la siguiente tabla:

Tabla 7. Especificaciones de las concentraciones empleadas para ESPINOZA 01.

Soluciones de Trabajo	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen de la Solución Inicial expresada en μL	Volumen del Medio de disolución (Danieau's 10x) expresada en μL
1	25	450	44,550
2	12,5	225	44,775
3	6,250	112,5	44,887
4	3,125	56,25	44,944

5

1,5625

28

44,972

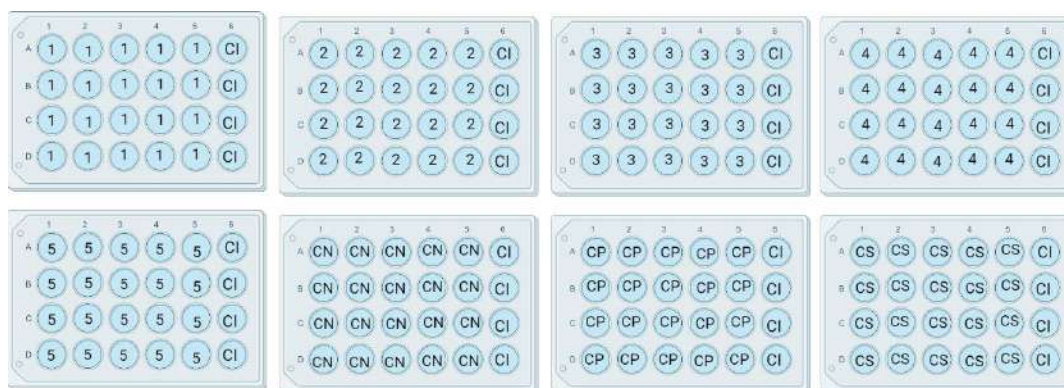
Tabla 8. Especificaciones de las concentraciones empleadas para HEREDIA 01.

Soluciones de Trabajo	Concentración (µg/mL)	Volumen de la Solución expresada en µL	Volumen del Medio de disolución (Danieau's 10x) expresada en µL
1	12,5	225	44,775
2	6,250	112,5	44,887
3	3,125	56,25	44,944
4	1,5625	28	44,972
5	0,78125	14	44,986

2.5.5. Preparación de las placas de trabajo.

Se emplearon placas de 24 pocillos en donde cumplidas las 3 horas post fertilización se colocaron los embriones viables individualmente en cada pocillo, distribuidos para las concentraciones de prueba (1-5), control negativo (CN), control positivo (CP), control del solvente (CS) y el control interno de la placa (CI) como se indica en la Fig.9:

Figura 9. Esquema de pipeteo.



Nota. 1-5: cinco concentraciones a probar; CI: control interno; CN: control negativo; CP: control positivo; CS: control de solvente, imagen modificada de OCDE, 2013. Cabe mencionar que en las columnas 1-5, se expusieron a los embriones en las concentraciones de prueba de cada extracto. En la última columna (6) se expuso a los embriones a un control interno correspondiente al medio de disolución Danieau's 10x, y, en cada pocillo se pipeteó 2mL de las respectivas soluciones.

Figura 10. Esquema general de procedimiento para la evaluación de letalidad y teratogenicidad de plantas medicinales.

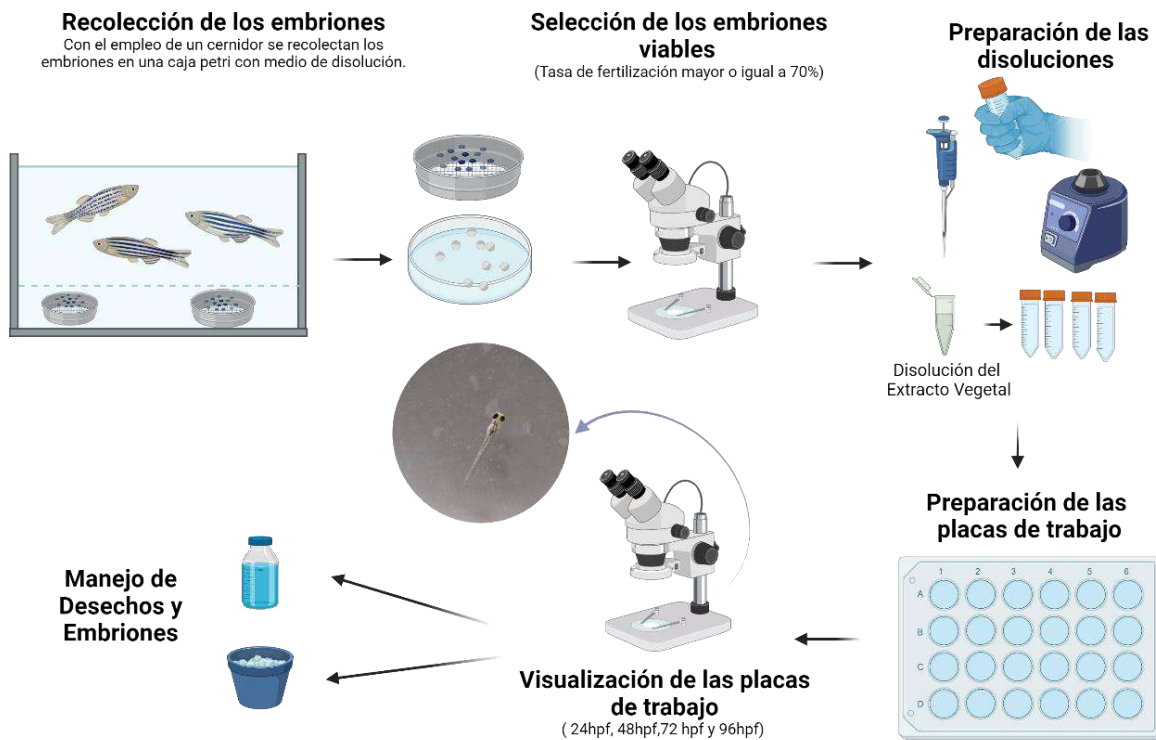


Imagen modificada de OCDE, 2013.

2.6. Valoración de los resultados.

La prueba inició 3 hpf durante un periodo de 96 h, registrando cada 24 h los siguientes criterios de valoración:

a) Criterios de Valoración de Letalidad.

Tabla 9. Lista de criterios empleados para valorar la letalidad.

Criterios de valoración de letalidad	Tiempo de exposición			
	24h	48h	72h	96h
Coagulación.	*	*	*	*
No desprendimiento de cola.		*	*	*
No formación de somitas.		*	*	*
Ausencia de latido cardíaco.		*	*	*
Falta de eclosión.				*
Muerte.	*	*	*	*

b) Criterios de Valoración de Teratogenicidad.

Tabla 10. Lista de criterios empleados para valorar la teratogenicidad.

Criterios de valoración de teratogenicidad	Tiempo de exposición			
	24h	48h	72h	96h
Malformación de la cola.		*	*	*
Malformación de la columna.			*	*
Deformación de la yema.	*	*	*	*
Retraso general del crecimiento.	*	*	*	*
Edema Pericárdico			*	*

2.7. Procesamiento de datos.

Se calcularon los promedios de los tres ensayos de cada planta y para verificar la validez de los resultados, se calculó el coeficiente de variación que correspondió a valores menores del 5 %.

Para el cálculo del LC_{50} , se empleo la herramienta “ LC_{50} Calculator AAT Bioquest” (<https://www.aatbio.com/tools/lc50-calculator>) con la cual se normalizaron las curvas obtenidas para cada extracto.

CAPÍTULO III.

3. Resultados y Discusión.

3.1. Rendimiento de los extractos metanólicos.

3.1.1. *Peperomia sp.*

Se tomó 10 g de extracto seco de *Peperomia* para obtener 1,0 g de extracto liofilizado.

$$\text{Rendimiento} = \text{Droga planta (g)} / \text{liofilizado (g)}$$

$$\text{Rendimiento} = 10 \text{ g} / 1,9121 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento} = 5,2298 \approx 5$$

$$\text{Rendimiento} = 5:1$$

3.1.2. *Otholobium mexicanum*.

Se tomó 10 g de extracto seco de *Otholobium mexicanum* para obtener 1,0 g de extracto liofilizado.

$$\text{Rendimiento} = \text{Droga planta (g)} / \text{liofilizado (g)}$$

$$\text{Rendimiento} = 10 \text{ g} / 1,5908 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento} = 6,2861 \approx 6$$

$$\text{Rendimiento} = 6:1$$

3.2. Toxicidad aguda.

Para la determinación de toxicidad aguda en *Peperomia sp.* se procedió a probar 5 diferentes concentraciones (25, 12.5, 6.250, 3.125 y 1.5625 µg/mL) y para *Otholobium mexicanum* (12.5, 6.250, 3.125, 1.5625 y 0.7813 µg/mL); concentraciones determinadas luego de haber probado un rango más amplio.

3.2.1. *Peperomia sp.*

En el ensayo de toxicidad aguda para la planta *Peperomia sp.*, se observó que a las 96 hpf la concentración más alta probada (25 $\mu\text{g/mL}$) tuvo una letalidad del 100 % y esta letalidad fue bajando conforme lo hacía la concentración. Tras realizar el análisis correspondiente de las tres repeticiones se determinó que las primeras concentraciones analizadas corresponden a un porcentaje mayor al 50 % de la letalidad. Cabe mencionar que, en la concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ se evidencio la letalidad durante las primeras 24 hpf, contrario a la segunda concentración, en donde la letalidad fue evidente a las 48 hpf. En contraste la concentración mínima tóxica corresponde a 1.5625 $\mu\text{g/mL}$ donde el porcentaje de letalidad corresponde a 3.33 % (Véase Tabla 11 y Fig. 11.).

Tabla 11. Letalidad de extracto metanólico de *Peperomia sp.* registrada a las 96 hpf.

	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Letalidad (%)
N = 20	25	100.00
	12.5	96.67
	6.25	83.33
	3.125	10.00
	1.5625	3.33
	Control (+)	100.00
	Control (-)	11.67
	C solvente	3.33

Figura 11. Coagulación a 24 hpf 25 $\mu\text{g/mL}$ *Peperomia sp.*



3.2.2. *Otholobium mexicanum*.

Para el ensayo de *Otholobium mexicanum* se evidenció que a las 48 hpf la concentración más alta probada (12.5 µg/mL) tiene una letalidad del 100 %; al realizar los ensayos por triplicado, se determinó que las dos primeras concentraciones probadas tienen una letalidad superior al 50 %. Finalmente se determinó que la mínima dosis letal es de 0.7813 µg/mL obteniéndose un 3.33 % de letalidad (Véase *tabla 12*).

Tabla 12. Letalidad de extracto metanólico de *Otholobium mexicanum* registrada a las 96 hpf.

	Concentración (µg/mL)	Letalidad (%)
N = 20	12.5	100.00
	6.25	76.67
	3.125	25.00
	1.5625	15.00
	0.7813	3.33
	Control (+)	100.00
	Control (-)	10.00
	C solvente	1.67

Figura 12. Coagulación tardía 96 hpf 6.25 µg/mL *Otholobium mexicanum*



3.2.3. Concentración letal 50.

Las curvas de LC₅₀ (Fig. 13 y Fig. 14) fueron elaboradas con los datos descritos en las tablas 11 y 12, en donde cabe destacar, que se realizó una normalización de las curvas y mediante éstas se pudo determinar el LC₅₀ correspondiente a cada planta, datos que se pueden apreciar en la Tabla 13.

Tabla 13. LC50 Determinado a las 96 hpf.

Extracto	<i>Peperomia</i> sp	<i>Otholobium mexicanum</i>
LC ₅₀ (µg/mL)	4.7556	5.0289
Ecuación	$Y = 3.1686 + \frac{98.4961 - 3.1686}{1 + \left(\frac{X}{4.7556}\right)^{-5.0758}}$	$Y = 10.9875 + \frac{98.623 - 10.9875}{1 + \left(\frac{X}{5.0289}\right)^{-4.151}}$

Figura 13. LC₅₀ para el extracto de *Peperomia* sp.

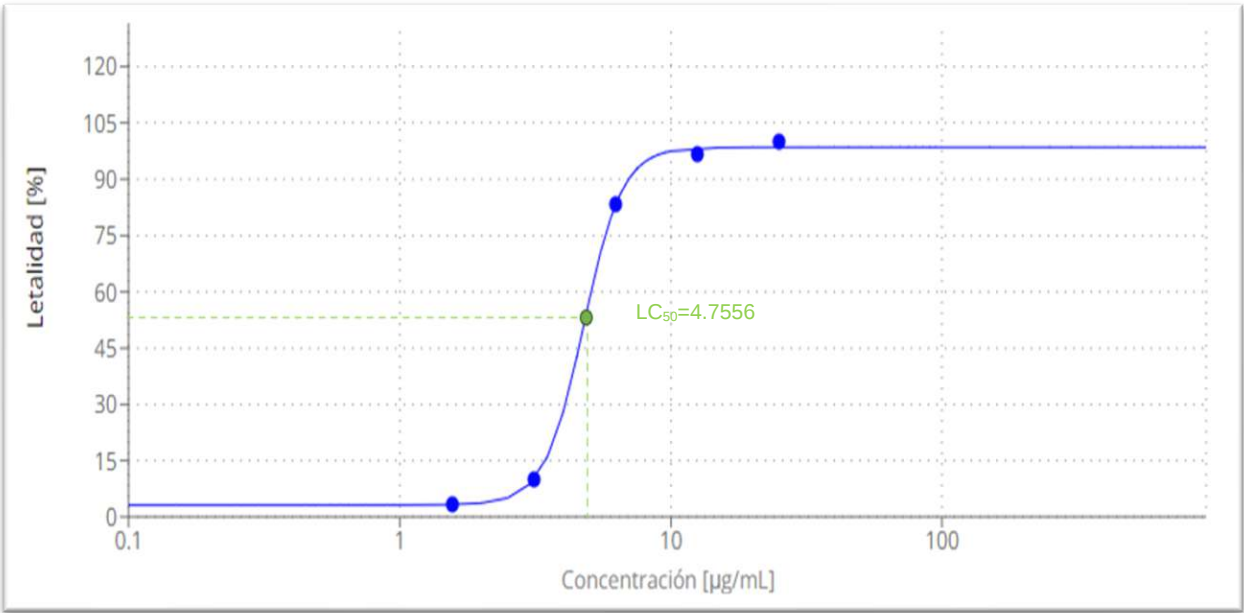
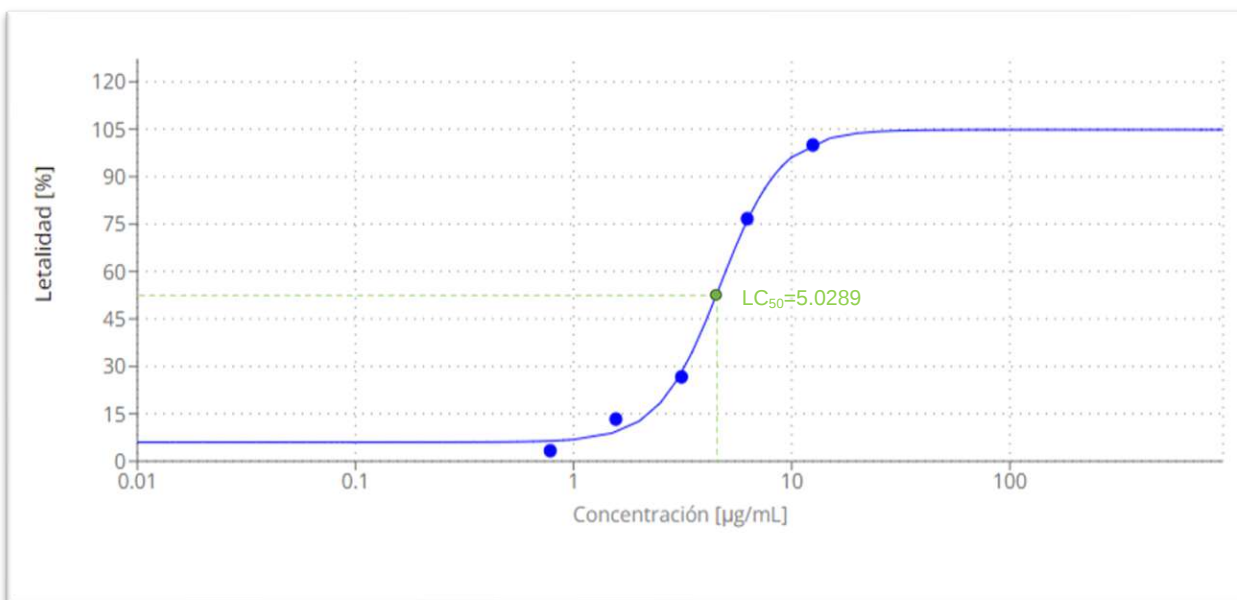


Figura 14. LC_{50} para el extracto de *Otholobium mexicanum*.



La letalidad se evaluó en base a los criterios establecidos por la OECD que correspondieron a: coagulación, no desprendimiento de la cola, no formación de somitas, ausencia de latido cardíaco, falta de eclosión y muerte, los cuales fueron observados en el transcurso de las 96 hpf.

Los resultados de letalidad aguda del extracto metanólico de *Peperomia sp*, evidencian que esta planta es tóxica, ya que el LC_{50} calculada a las 96 hpf fue de 4.7556 µg/mL (Fig. 13). Por otro lado, *Otholobium mexicanum* presentó una LC_{50} de 5.0288 µg/mL (Fig. 14); ligeramente mayor que *Peperomia sp*. Para ambas sustancias tras realizar una búsqueda bibliográfica se encontraron datos de toxicidad utilizando *Artemia salina* como modelo animal. En el caso de *Peperomia sp*, existen estudios que evalúan la toxicidad del aceite esencial de *Peperomia* reportando valores de LC_{50} de 1.9 ± 0.1 µg/mL para *P. rotundifolia*, 2.4 ± 0.5 µg/mL para *P. pellucida* y 9.0 ± 0.4 µg/mL para *P. macrostachya* (Mesquita et al., 2021). Por otro lado, Onocha y Olaniran, 2011 determinaron un valor de LC_{50} en la fracción metanólica de 260.89 µg/mL de *Peperomia pellucida*. A pesar de que tanto las especies como el tipo de extractos son diferentes, se puede hacer una comparación aproximada con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Los resultados del presente trabajo indican que *Peperomia sp* tiene una toxicidad alta debido a su bajo LC_{50} de 4.7556 µg/mL valor ligeramente cercano a lo reportado en los trabajos citados en aceites esenciales, pero muy diferente al LC_{50} de la fracción metanólica de *Peperomia pellucida*, lo cual nos indica que las especies probablemente tienen compuestos químicamente diferentes.

Uno de los parámetros clave para evaluar la letalidad es la coagulación, está generalmente ocurre pocas horas después del inicio de la exposición al compuesto tóxico y es un indicativo de muerte temprana, por esta razón es usado como un criterio en la mayoría de ensayos FET (European Commission Centre, 2014; von Hellfeld et al., 2020). Sin embargo esto no sucedió al evaluar la toxicidad de *Otholobium mexicanum*, pues en esta planta se dio una coagulación tardía donde los embriones se coagularon entre las 24 y 72 hpf y en el caso de este criterio se podía observar que iniciaba en la cola y el saco vitelino, un patrón similar al observado por Hellfeld y colaboradores al realizar la prueba FET para 3,4- dichloranilina (von Hellfeld et al., 2020).

Aunque si se logró llevar a cabo la prueba FET es preciso mencionar que una de las principales limitaciones que se observaron al realizar este proceso experimental fue lograr una solubilidad completa de los extractos. Sin embargo, este inconveniente se pudo solventar mediante la disolución en DMSO 1 % empleando un orden específico; se colocó 100 µL de DMSO y se solubilizó el extracto empleando un vortex y sonicador, a continuación se colocó el medio Danieau's 10x, este método no ha sido reportado en la bibliografía; sin embargo el uso de DMSO a concentraciones de 0.1 %, 0.5 % y 1 % si ha sido empleado en casos de ensayos con compuestos de solubilidad limitada en agua (von Hellfeld et al., 2020). En nuestro caso, las soluciones probadas obedecieron a una concentración de 0.1 % DMSO, siendo importante destacar que, lograr una buena solubilidad del extracto, es un proceso clave en esta técnica pues todos los componentes serán absorbidos por los embriones mediante difusión.

3.3. Teratogenicidad.

Como criterios de teratogenicidad se eligieron: retraso general del crecimiento, deformación de la yema, malformación de cola, malformación de columna y edema pericárdico. Los resultados se presentan en las tablas 14 a 21 que se muestran a continuación, estos criterios han sido organizados en orden de aparición durante los ensayos. A las 24 hpf se visualizó retraso general del crecimiento, deformación de yema, a las 48 hpf se observaron malformaciones en la cola, a las 72 hpf se observan edema pericárdico y a las 96 hpf se observó malformación de columna y huevos no eclosionados.

3.3.1. *Peperomia* sp.

En el caso de *Peperomia* sp se observó que el mayor porcentaje de embriones que tuvieron criterios de teratogenicidad correspondieron a la concentración de 6.25 µg/mL, obteniéndose un 85 % de retraso de crecimiento, un 36.67 % de deformación de yema a las 24 hpf (Véase *Tabla*

14 y Fig. 15), en esta concentración no se observan presencia de criterios de teratogenicidad en hpf posteriores debido a que ya se da la muerte de los embriones.

A las 48 hpf se evaluó la malformación de cola, este criterio de teratogenicidad se hizo evidente en las concentraciones de 3.125 y 1.5625 $\mu\text{g/mL}$ con valores de 16.67 y 3.33 % respectivamente (Véase Tabla 15 y Fig. 16). Finalmente, en la evaluación de los últimos dos criterios se mantuvo la tendencia donde los criterios teratogénicos se presentaron en las dos concentraciones más bajas, observándose edema pericárdico en el 20 % de los embriones evaluados a la concentración de 3.125 $\mu\text{g/mL}$ (Véase Tabla 16 y Fig.17) y malformación de columna en 1.67 % de los embriones expuestos a la concentración de 3.125 $\mu\text{g/mL}$ (Véase Tabla 17 y Fig.18).

Tabla 14. Resultados de teratogenicidad de extracto metanólico de *Peperomia sp* a las 24 hpf.

	(N=20)	Muerte	Retraso general de crecimiento	Deformación de yema
	<i>Peperomia sp</i> $\mu\text{g/mL}$	%	%	%
24 hpf	Control	5	0	0
	25	100	-	-
	12.5	96.67	-	-
	6.25	18.33	85	36.67
	3.125	8.33	0	0
	1.5625	1.67	0	0

Nota. (-) muerte de los embriones.

Figura 15. Retardo de crecimiento y Deformación de yema en embriones expuestos a *Peperomia sp*.



Nota. Deformación de yema (DY), Retardo general del crecimiento (RC).

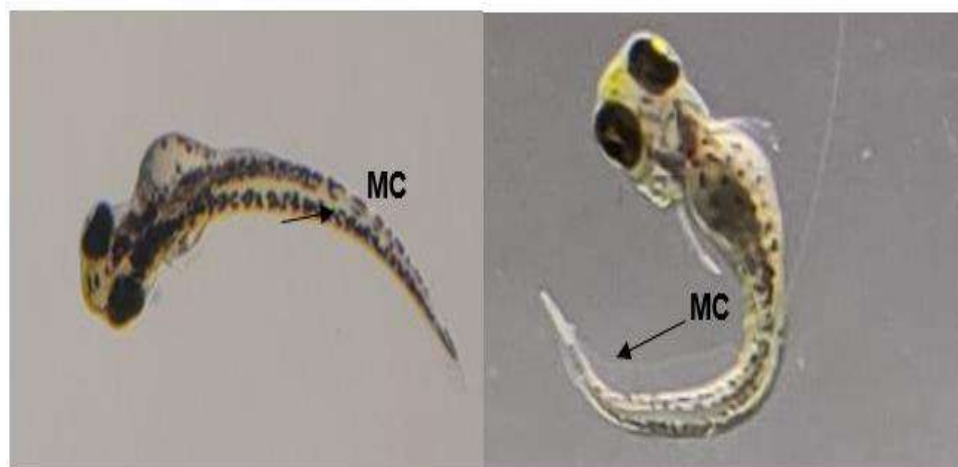
Tabla 15. Resultados de teratogenicidad de extracto metanólico de *Peperomia sp* a las 48 hpf.

	(N=20)	Muerte	Malformación de cola
	<i>Peperomia sp</i> µg/mL	%	%
48 hpf	Control		
	25	100.00	0
	12.5	96.67	-
	6.25	80.00	-
	3.125	11.67	16.67
	1.5625	3.33	3.33

Nota. (-) muerte de los embriones.

Figura 16. Malformación de cola en embriones expuestos a *Peperomia sp*.

96 hpf 6.25 µg/mL.



Nota. Malformación de cola (MC).

Tabla 16. Resultados de teratogenicidad de extracto metanólico de *Peperomia sp* a las 72 hpf.

	(N=20)	Muerte	Edema Pericárdico
	<i>Peperomia sp</i> µg/mL	%	%
72 hpf	Control	0	0

25	100.00	-
12.5	96.67	-
6.25	81.67	0
3.125	11.67	20
1.5625	3.33	0

Nota. (-) muerte de los embriones.

Figura 17. Edema pericárdico en embriones expuestos a *Peperomia* sp.

72 hpf 3.125 $\mu\text{g/mL}$



Nota. Malformación de cola (MC), Edema pericárdico (EP).

Tabla 17. Resultados de teratogenicidad de extracto metanólico de *Peperomia* sp a las 72 hpf.

(N=20)		Muerte	Malformación de columna
<i>Peperomia</i> sp $\mu\text{g/mL}$		%	%
96 hpf	Control	0.00	0
	25	100.00	-
	12.5	96.67	-
	6.25	81.67	-
	3.125	11.67	0
	1.5625	3.33	1.67

Nota. (-) muerte de los embriones.

Figura 18. Malformación de columna en embriones expuestos a *Peperomia* sp.

96 hpf 1.5625 $\mu\text{g/mL}$.



Nota. Malformación de columna (MCO), Deformación de yema (DY).

3.3.2. *Otholobium mexicanum*.

La teratogenicidad de *Otholobium mexicanum* muestra una tendencia variable donde en las 24 hpf los embriones que están en contacto con la concentración de 12.5 $\mu\text{g/mL}$ presentan una teratogenicidad de 91.67 % correspondiente al criterio de retraso de crecimiento, sin embargo, estos mueren a las 48 hpf por lo que no se pudo visualizar si en esta concentración también se presentaba otro criterio de teratogenicidad (Véase *Tabla 18 y Fig. 19*). Por otro lado, en la concentración de 6.25 $\mu\text{g/mL}$ se observó que hay un 68.33 % de embriones con retraso general de crecimiento, seguidos de un 15 % con malformación de cola (Véase *Tabla 18-19 y Fig. 19-20*), en la segunda visualización a las 48 hpf se evidenció la presencia de más criterios de teratogenicidad como la malformación de yema, malformación de columna y edema pericárdico (*Tabla 18 a 21*), es decir, a las 48 hpf esta concentración ya presentó todos los criterios elegidos para este estudio. Adicional a esto, en la concentración de 3.125 $\mu\text{g/mL}$ se observó a las 48 hpf un retraso de crecimiento de 70 % y un 5 % de embriones con edema pericárdico (Véase *tabla 20 y Fig. 21*), sin embargo, es necesario mencionar que en esta concentración no se evidenció la presencia de todos los criterios de teratogenicidad seleccionados.

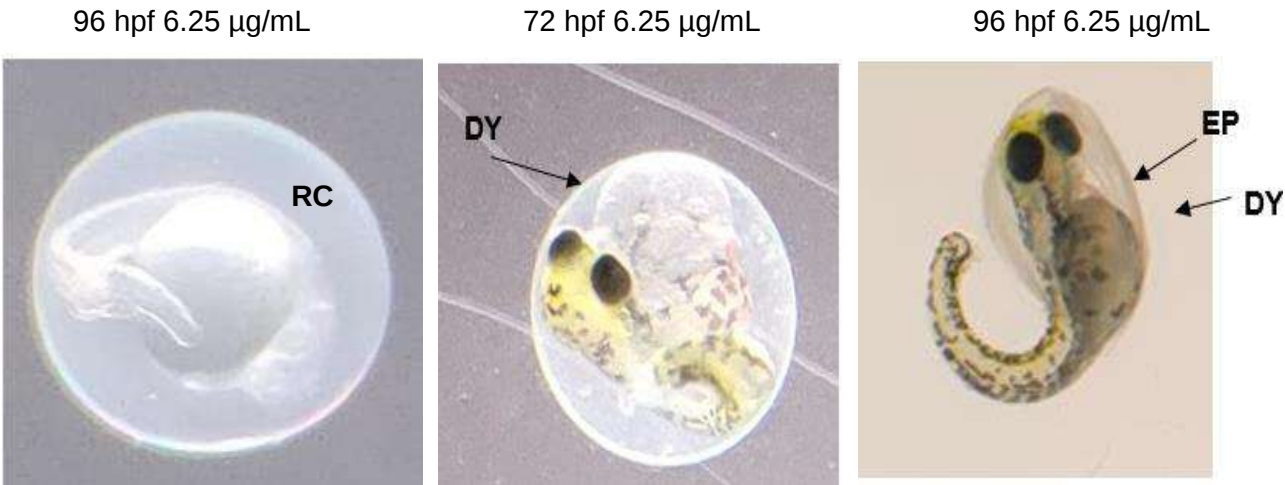
Tabla 18. Resultados de teratogenicidad de extracto metanólico de Otholobium mexicanum a las 24 hpf.

	(N=20) <i>Otholobium</i> <i>mexicanum</i> $\mu\text{g/mL}$	Muerte %	Retraso general de crecimiento %	Deformación de yema %
24 hpf	Control	3.33	0	0
	12.5	10.00	91.67	0
	6.25	23.33	68.33	15.00

3.125	15.00	5	0
1.56	15.00	0	0
0.78	0.00	0	0

Nota. (-) muerte de los embriones.

Figura 19. Deformación de yema en embriones expuestos a *Otholobium mexicanum*.



Nota. Retraso Crecimiento (RC), Edema pericárdico (EP), Deformación de yema (DY)

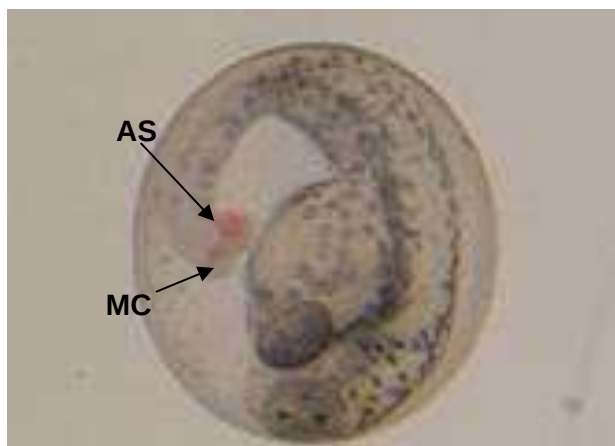
Tabla 19. Resultados de teratogenicidad de extracto metanólico de *Otholobium mexicanum* a las 48 hpf.

(N=20)		Muerte	Malformación de cola
<i>Otholobium mexicanum</i> µg/mL		%	%
48 hpf	Control	7.50	0
	12.5	100.00	-
	6.25	50.83	15
	3.125	20.00	0
	1.56	13.33	17.5
	0.78	2.50	0

Nota. (-) muerte de los embriones.

Figura 20. Malformación de cola en embriones expuestos a *Otholobium mexicanum*.

72 hpf 6.25 µg/mL



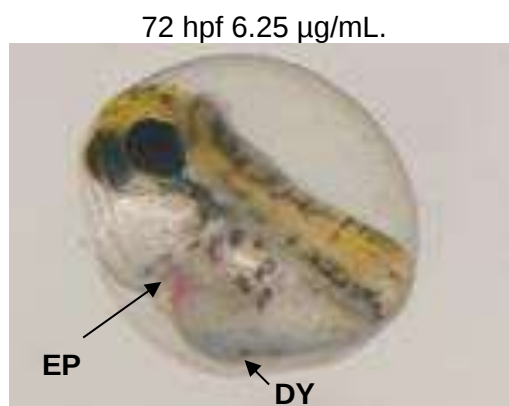
Nota. Malformación de cola (MC), acumulación de sangre (AS).

Tabla 20. Resultados de teratogenicidad de extracto metanólico de Otholobium mexicanum a las 72 hpf.

	(N=20)	Muerte	Edema pericárdico
	<i>Otholobium mexicanum</i> µg/mL	%	%
72 hpf	Control	7.50	5.00
	12.5	100.00	-
	6.25	66.00	7.50
	3.125	21.67	5.00
	1.56	13.33	15.00
	0.78	1.67	0

Nota. (-) muerte de los embriones.

Figura 21. Edema pericárdico en embriones expuestos a Otholobium mexicanum.



Nota: Edema pericárdico (EP), deformación de yema (DY).

Tabla 21. Resultados de teratogenicidad de extracto metanólico de *Otholobium mexicanum* a las 96 hpf.

	(N=20)	Muerte	Malformación de la columna
	<i>Otholobium mexicanum</i> µg/mL	%	%
96 hpf	Control	11.67	0
	12.5	100.00	-
	6.25	76.67	5.00
	3.125	25.00	0
	1.56	15.00	0
	0.78	3.33	10.00

Nota. (-) muerte de los embriones.

Figura 22. Malformación de la columna en embriones expuestos a *Otholobium mexicanum*.



Nota. Deformación de yema (DY). Malformación de columna (MCO).

Los criterios empleados para la evaluación de teratogenicidad corresponden a: malformación de cola, malformación de columna, deformación de la yema, retraso general del crecimiento y edema pericárdico.

La teratogenicidad es un efecto que muy pocas veces se toma en cuenta cuando se da el consumo de plantas medicinales pues en la mayoría de los casos este consumo se lo realiza por conocimiento tradicional y cultural. Sin embargo, las plantas medicinales tienen múltiples compuestos que pueden causar alteraciones en el desarrollo entre los principales destacan:

alcaloides, terpenos, flavonoides, esteroides, carbohidratos, cianuro, M licopeno, polifenoles, ácidos, aldehídos, aminoácidos, β -carotenos, ácidos grasos, lactonas, gingeroles, lectinas, peróxidos, policétidos y esteroides (Chamorro-Cevallos et al., 2022).

Los fenilpropanoides dillapiol y apiol están presentes en el aceite esencial de *P. pellucida* (Moraes & Kato, 2021), estudios demuestran que el apiol es un compuesto con actividad hepatotóxica, nefrotóxica y abortiva debido a que: una dosis única de apiole de perejil (10 ml/kg) es capaz de matar a ratones en 60h debido a la toxicidad hepática y renal, por otro lado, dosis de 5 a 14 g dosificadas a conejas en estado de gestación provocaron hemorragia grave e indujeron el aborto (Dosoky & Setzer, 2021). Las propiedades de este compuesto en particular podrían ser las causantes de la teratogenicidad observada en los embriones expuestos al extracto metanólico de *Peperomia sp.*

En el caso de *Otholobium mexicanum* los principales componentes aislados del extracto metanólico son: Bakuchiol, hydroxybaku-chiol, daidzin, and genistin (Armijos et al., 2018). Daidzin es un fitoestrógeno que en el metabolismo pasa a daizeina el cual tiene un efecto estrogénico, Romero y colaboradores investigaron la acción de estas isoflavonas en ratas preñadas en las siguientes proporciones daidzin + daidzein 22.7 %, daidzein 16.9 %, genistin + genisteína 16.3 %, genisteína 13.1% y concluyeron que no se da una toxicidad materna sin embargo a dosis de 10 mg/kg y 100 mg/kg se evidencia una reducción significativa de fetos vivos y a dosis de 100 mg/kg se produce reabsorción de los fetos (Romero et al., 2008). Debido a esto podríamos decir que una de las causas de teratogenicidad es la presencia de estas dos isoflavonas sin embargo es importante realizar la determinación de los compuestos que posee el extracto metanólico de esta planta para identificar a cabalidad todos los componentes.

El corazón es uno de los primeros órganos funcionales que desarrolla el pez cebra y es por esto que el latido cardiaco es un punto de corte en algunos estudios de toxicología, ya que evidencia el desarrollo completo y funcional del corazón, su funcionalidad puede verse afectada por el edema cardiaco el cual es una respuesta general a un ambiente tóxico (Chahardehi et al., 2020; Li et al., 2018). En el caso de la evaluación teratogénica de *Otholobium mexicanum* se pudo observar criterios de teratogenicidad a las 48 hpf y en un mayor porcentaje en la concentración de 1.56 $\mu\text{g/mL}$ seguido de la concentración 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Una de las posibles razones de que el edema pericárdico se de en mayor cantidad en una concentración menor es que algunas malformaciones leves no letales son moderadas por el aumento de la inmunidad durante el

desarrollo del pez cebra (Li et al., 2018) . En contraste en el caso de *Peperomia sp* la presencia de edema pericárdico se ve a las 72 hpf y únicamente a la concentración de 3.125 µg/mL.

Las alteraciones de la yema en una prueba de toxicidad son puntos de corte ampliamente usados pues se traducen en una reducción de absorción de nutrientes por parte del embrión, estas alteraciones pueden darse por la sobrehidratación de la osmorregulación y la acumulación de toxinas en el saco vitelino (Chahardehi et al., 2020). Tanto en los ensayos de *Otholobium mexicanum* como en *Peperomia sp* se pudo observar una deformación de la yema. En *Peperomia sp* se observó que un 36.67 % de embriones presentaron deformación de la yema a las 24 hpf en la concentración de 6.25 µg/mL, por el contrario, en *Otholobium mexicanum* se observó una deformación de la yema en el 15 % de los embriones expuestos a la concentración de 6.25 µg/mL a las 24 hpf. Como se sabe la yema puede agregar xenobióticos del ambiente acuático circundante a la yema de los peces, y también se puede llevar a cabo el fenómeno de bioacumulación, el cual es posible se haya dado en el caso de *Otholobium mexicanum* y por esta razón la deformación se haya presentado en un periodo de 48 hpf. Esta captación de compuestos del medio se lleva a cabo mediante movimiento pasivo o activo de las moléculas a través del epitelio del saco vitelino (Sant & Timme-Laragy, 2018) .

Por otro lado, también sería relevante identificar el fenotipo de yema provocado por cada una de nuestras plantas pues, cuando hay una retención de yema correspondería a la disminución de la movilidad/uso o malabsorción de la yema. En contraste el uso rápido de la yema conduce a un área de la yema más pequeña e indica un mayor movimiento o uso de la yema (Chahardehi et al., 2020). Se debe prestar atención a este punto de corte debido a que este puede desencadenar la malformación de otros sistemas y órganos, contribuir a la mala absorción nutricional y la mortalidad embrionaria tardía.

Finalmente, cabe mencionar que, debido a limitaciones prácticas en el manejo del modelo biológico de pez cebra como evaluador de toxicidad de plantas medicinales se ha decidido utilizar una sola muestra de cada especie vegetal a fin de establecer una base referencial sobre la posible toxicidad de los extractos vegetales de estas dos especies.

4. Conclusiones.

Tras el análisis de los extractos metanólicos estudiados se determinó que la dosis LC₅₀ de *Peperomia sp* es de 4.7556 µg/mL y del extracto metanólico de *Otholobium mexicanum* es de

5.0288 µg/mL, debido a que los valores son relativamente bajos, se puede decir que las dos plantas de estudio deben ser consideradas potencialmente tóxicas.

La teratogenicidad es un criterio relevante para analizar como un estudio preliminar en el desarrollo de fármacos a partir de plantas medicinales. En las dos plantas estudiadas se demostró que tienen un potencial teratogénico, pues se pudo visualizar todos los criterios elegidos: Retraso general de crecimiento, deformación de yema, malformación de cola, malformación de columna y edema pericárdico. La teratogenicidad de *Peperomia sp*, fue clara donde la concentración a la que se observaron mayores características teratogénicas corresponde a 6.25 µg/mL. En contraste la teratogenicidad de *Otholobium mexicanum* fue variable pues los criterios elegidos se daban a diferentes concentraciones siendo las más prevalentes 6.25 µg/mL y 3.125 µg/mL.

5. Recomendaciones.

Realizar más repeticiones de los ensayos realizados, en el caso de *Otholobium mexicanum* se considera que se deberían probar concentraciones más cercanas para poder determinar con exactitud la concentración teratogénica.

Evaluar la teratogenicidad empleando otros parámetros como por ejemplo índices de gravedad de anormalidad, ya que mediante este se puede establecer un valor único que es más claro para correlacionar.

En futuros ensayos considerar también la evaluación del daño cardiaco al embrión pues se evidenció un alto porcentaje de edema pericárdico lo que repercute en la función normal del corazón.

6. Referencias.

- Adhish, M., & Manjubala, I. (2023). Effectiveness of zebrafish models in understanding human diseases—A review of models. *Heliyon*, 9(3), e14557. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14557>
- Akhila, J. S., Shyamjith, D., & Alwar, M. C. (2007). Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. *Current Science*, 93(7), 917–920. <http://www.jstor.org/stable/24099255>
- Andersen, M. L., & Winter, L. M. F. (2019). Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 91(suppl 1). <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170238>
- Armijos, C., Ma, M., Mc, G.-B., Cuenca, M., & Suárez, A. (2018). Antioxidant properties of medicinal plants used in the Southern Ecuador. *Undefined*.
- Bauer, B., Mally, A., & Liedtke, D. (2021). Zebrafish Embryos and Larvae as Alternative Animal Models for Toxicity Testing. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 13417, 22(24), 13417. <https://doi.org/10.3390/IJMS222413417>
- Bermúdez del Sol, A., Cárdenas Pazmiño, Á., & Neira Briones, J. (2022). *Uso tradicional de las plantas medicinales por la población del Cantón Salcedo, Cotopaxi, Ecuador*. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.6743038>
- Caballero, M. V., & Candiracci, M. (2018). Zebrafish as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy. *Zebrafish as Screening Model for Detecting Toxicity and Drugs Efficacy*, 3, 4. <https://doi.org/10.20517/2572-8180.2017.15>
- Carrion Jara, A. V., & García Gómez, C. R. (2010). "PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES. *Universidad de Cuenca*.
- Cassina, M., Cagnoli, G. A., Zuccarello, D., Di Gianantonio, E., & Clementi, M. (2017). Human teratogens and genetic phenocopies. Understanding pathogenesis through human genes mutation. *European Journal of Medical Genetics*, 60(1), 22–31. <https://doi.org/10.1016/J.EJMG.2016.09.011>
- Chahardehi, A. M., Arsad, H., & Lim, V. (2020). Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. *Undefined*, 9(10), 1–35. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9101345>
- Chamorro-Cevallos, G., Mojica-Villegas, M. A., García-Martínez, Y., Pérez-Gutiérrez, S., Madrigal-Santillán, E., Vargas-Mendoza, N., Morales-González, J. A., & Cristóbal-Luna, J. M. (2022). A Complete Review of Mexican Plants with Teratogenic Effects. *Plants* 2022, Vol. 11, Page 1675, 11(13), 1675. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11131675>
- D'Costa, A., & Shepherd, I. T. (2009). Zebrafish Development and Genetics: Introducing

- Undergraduates to Developmental Biology and Genetics in a Large Introductory Laboratory Class. *https://Home.Liebertpub.Com/Zeb*, 6(2), 169–177. <https://doi.org/10.1089/ZEB.2008.0562>
- de Moraes, M. M., & Kato, M. J. (2021). Biosynthesis of Pellucidin A in *Peperomia pellucida* (L.) HBK. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.641717/FULL>
- Dosoky, N. S., & Setzer, W. N. (2021). Maternal Reproductive Toxicity of Some Essential Oils and Their Constituents. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5). <https://doi.org/10.3390/ijms22052380>
- European Commission Centre. (2014). *Recommendation on the Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test Method (ZFET) for Acute Aquatic Toxicity Testing*. <https://doi.org/10.2788/87475>
- García, G. R., Noyes, P. D., & Tanguay, R. L. (2016). Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. *Pharmacology & Therapeutics*, 161, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.009>
- Gobernacion Chacabuco. (2007). *Leccion 4: Toxicidad*. <http://www.gobernacionchacabuco.gov.cl/filesapp/Toxico.pdf.pdf>
- Gonçalves Reis, L. de P. (2022). Evaluación de la toxicidad del Bisfenol A sobre la reproducción y el desarrollo del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo experimental. *Universidad de Cordoba*. <https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>
- Graf, B. L., Rojas-Silva, P., & Baldeón, M. E. (2016). Discovering the Pharmacological Potential of Ecuadorian Market Plants using a Screens-to-nature Participatory Approach. *Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.4172/2376-0214.1000156>
- Guillermo, R. F., Bonilla R, P. E., & Arroyo A., J. L. (2005). Comprobación del efecto cicatrizante de *Peperomia scutellaefolia* R et P. aspectos botánicos, químicos y farmacológicos. *Ciencia e Investigación*, 8(1), 9–16. <https://doi.org/10.15381/ci.v8i1.5215>
- Gutierrez, Y. V., Yamaguchi, L. F., de Moraes, M. M., Jeffrey, C. S., & Kato, M. J. (2016). Natural products from *Peperomia*: occurrence, biogenesis and bioactivity. *Phytochemistry Reviews* 2016 15:6, 15(6), 1009–1033. <https://doi.org/10.1007/S11101-016-9461-5>
- Huang, Y. W., Tuofo, A. J., & Tan, R. S. (2022). Hepatotoxicity and Mutagenicity assessment during chronic in vivo exposure to aqueous extracts from *Peperomia pellucida*. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 94(2), e20191255–e20191255. <https://doi.org/10.1590/0001-376520220191255>
- Jayasinghe, C. D., & Jayawardena, U. A. (2019). Toxicity Assessment of Herbal Medicine Using Zebrafish Embryos: A Systematic Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative*

- Medicine*, 2019, 7272808. <https://doi.org/10.1155/2019/7272808>
- Jerves-Andrade, L., Le&on-Tamariz*, F., Peñaherrera, E., Cuzco, N., Tobar, V., Ansaloni, R., Maes, L., & Wilches, I. (2014). Medicinal plants used in South Ecuador for gastrointestinal problems: An evaluation of their antibacterial potential. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(45), 1310–1320. <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5656>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/AJA.1002030302>
- Kittipaspallop, W., Taepavarapruk, P., Chanchao, C., & Pimtong, W. (2019). Acute toxicity and teratogenicity of α -mangostin in zebrafish embryos. *https://doi.org/10.1177/1535370218819743*, 243(15–16), 1212–1219. <https://doi.org/10.1177/1535370218819743>
- Krakovska-Sieprawska, A., Kielbasa, A., Rafińska, K., Ligor, M., & Buszewski, B. (2022). Modern Methods of Pre-Treatment of Plant Material for the Extraction of Bioactive Compounds. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 730, 27(3), 730. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27030730>
- Li, H., Yu, S., Cao, F., Wang, C., Zheng, M., Li, X., & Qiu, L. (2018). Developmental toxicity and potential mechanisms of pyraoxystrobin to zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 151, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2017.12.061>
- McCluskey, B. M., & Braasch, I. (2019). Zebrafish phylogeny and taxonomy. *The Zebrafish in Biomedical Research: Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications*, 15–24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00002-6>
- Mesquita, K. D. S. M., Feitosa, B. de S., Cruz, J. N., Ferreira, O. O., Franco, C. de J. P., Cascaes, M. M., Oliveira, M. S. de, & Andrade, E. H. de A. (2021). Chemical Composition and Preliminary Toxicity Evaluation of the Essential Oil from *Peperomia circinnata* Link var. *circinnata*. (Piperaceae) in *Artemia salina* Leach. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 7359, 26(23), 7359. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26237359>
- OECD. (2013). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, July*, 1–22. <http://www.oecd-ilibrary.org>
- Oleas, N., Ríos, B., Peña, P., & Bustamante, M. (2016). Plantas de las quebradas de Quito : guía práctica de identificación de plantas de ribera. In *Hierbas y Enredaderas Nativas Comunes*.
- Ooka, J. K., Correia, M. V., Scotti, M. T., Fokoue, H. H., Yamaguchi, L. F., Kato, M. J., Dayan, F. E., & Owens, D. K. (2022). Synthesis and Activity of 2-Acyl-cyclohexane-1,3-dione Congeners Derived from *Peperomia* Natural Products against the Plant p-

- Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase Herbicidal Molecular Target Site. *Plants*, 11(17), 2269. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11172269/S1>
- Ponce Cobos, J. J. (2019). *Composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de Peperomia galoides Kuth y actividad fotoprotectora in vitro en emulsión dermatocósmética*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Rivero-Guerra, A. O. (2021). Uso tradicional de especies de plantas en trece provincias de Ecuador. *Collectanea Botanica*, 40, e002. <https://doi.org/10.3989/collectbot.2021.v40.002>
- Rojas Leonart, I., García Gasca, S. A., & Bárcenas Ibarra, A. (2015). Teratogénesis; consideraciones y actualización. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 16(9), 1–16. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63641785001>
- Romero, V., Cruz, D., & Pereira, O. C. M. (2008). Reproductive and toxicological effects of isoflavones on female offspring of rats exposed during pregnancy. *Anim. Reprod*, 5, 83–89.
- Ruffieux, L. (2020). *Morphological And Phenotypic Characteristics Of Zebrafish Embryos - Bionomous*. <https://bionomous.ch/articles/morphological-and-phenotypic-characteristics-of-zebrafish-embryos/>
- Sant, K. E., & Timme-Laragy, A. R. (2018). Zebrafish as a Model for Toxicological Perturbation of Yolk and Nutrition in the Early Embryo. *Current Environmental Health Reports*, 5(1), 125. <https://doi.org/10.1007/S40572-018-0183-2>
- Vargesson, N., & Fraga, L. (2017). Teratogenesis. In *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1–7). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0026056>
- von Hellfeld, R., Brotzmann, K., Baumann, L., Strecker, R., & Braunbeck, T. (2020). Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Sciences Europe*, 32(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S12302-020-00398-3/FIGURES/3>
- Ware, I., Franke, K., Hussain, H., Morgan, I., Rennert, R., & Wessjohann, L. A. (2022). Bioactive Phenolic Compounds from *Peperomia obtusifolia*. *Molecules*, 27(14), 4363. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27144363/S1>
- Wiegand, J., Avila-Barnard, S., Namarugommula, C., Lyons, D., Zhang, S., Stapleton, H. M., & Volz, D. C. (2023). Triphenyl phosphate-induced pericardial edema in zebrafish embryos is dependent on the ionic strength of exposure media. *Environment International*, 172, 107757. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2023.107757>

Anexos

ANEXO A. Reactivos y equipos empleados para el desarrollo de la metodología.

Reactivos

- Metanol ($\geq 99,8$ %, Sigma-Aldrich, Merck Alemania).
- Extracto metanólico de *Peperomia* sp.
- Extracto metanólico de *Otholobium mexicanum*.
- Dimetil sulfóxido (DMSO sigma-aldrich $\geq 99,9$ %).
- Medio de disolución Danieau's:
Hepes $\geq 99,5$ % (Sigma-Aldrich Merck Alemania).
Cloruro de potasio 99.0 – 100.5% (Sigma-Aldrich, Merck Alemania).
Nitrato de calcio tetrahidratado 99 % % (Sigma-Aldrich, Merck Alemania).
Cloruro de sodio (Merck Alemania).

Equipos

- Secador electrónico de plantas (Pro-3, Ecuador).
- Rotavapor Heidolph laborota 4000 Efficient (Schwabach, Alemania).
- Baño María Branson (Branson 2510, Estados Unidos).
- Liofilizador LABCONCO (No. 7670520, Estados Unidos).
- Balanza analítica (BOECO XX43-0035 Germany).
- Estereomicroscopio (OLYMPUS, SZX2-ILLT, Japón).
- Bio freezer No Serie 0145903101140804.