

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y TOXICIDAD

**Catalina Leos-Rivas, Catalina Rivas-Morales,
David Gilberto García-Hernández**

Laboratorio Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas de la
Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

catalina.leosrs@uanl.edu.mx, catalina.rivasmr@uanl.edu.mx,
david.garciahn@uanl.edu.mx

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.333>

Leos-Rivas, C., Rivas-Morales, C., & García-Hernández, D. (2016). Actividad antioxidante y toxicidad. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 41-76.

Resumen

Los radicales libres se definen como cualquier especie química capaz de existir de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura, por lo tanto son altamente reactivos; también son conocidos como especies reactivas del oxígeno y especies reactivas del nitrógeno. Éstos pueden producir daño oxidativo en macromoléculas biológicas como el DNA, lípidos, carbohidratos y proteínas. Estos participan en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades, tales como: cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares, procesos reumáticos, patologías gastroentéricas, afecciones broncopulmonares o procesos neurodegenerativos. También están implicados en procesos fisiológicos como el envejecimiento, el daño causado por el ejercicio físico agotador y otros. Por esto es necesario contar con una batería de ensayos que nos permitan obtener información complementaria sobre ellos. El uso de radicales estables coloreados se recomiendan como criterio preliminar para jerarquizar las distintas plantas, extractos o fracciones de éstos, de acuerdo a su poder antioxidante. En este capítulo abordaremos algunas técnicas de rutina para la determinación de la capacidad antiradicalaria. Por otro lado es importante el estudio de la toxicidad de extractos, fracciones o moléculas aisladas de las plantas; si se determina esta se puede calcular el índice terapéutico del extracto o compuesto para utilizarlo con dosis subtóxicas. El Índice Terapéutico refleja la seguridad relativa de un medicamento o compuesto en su selectividad de acción. También se presentan protocolos para la determinación de la toxicidad en varios niveles debido a que es de vital importancia que los profesionales en esta área estén familiarizados con los métodos abreviados que existen para evaluar la toxicidad aguda de un producto, los cuales en su momento se crearon para cumplir con el principio de las 3 «R» (Reducción, Refinamiento y Reemplazo), y de esta forma utilizar una menor cantidad de animales en sus investigaciones.

Palabras clave

Actividad antioxidante de plantas, radicales libres, toxicidad crónica, toxicidad aguda.

2.1. Actividad antioxidante

El estudio de la capacidad antioxidante de las plantas medicinales y alimenticias ha crecido en las últimas décadas ya que un número importante de productos obtenidos de éstas, como los aceites esenciales, alcaloides y los polifenoles, poseen efectos antioxidantes los cuales son evidenciados mediante diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo* asociadas a cada uno de ellos. Por su elevado consumo a través de la dieta y la presencia ubicua en muchas especies vegetales, el potencial de los polifenoles como agentes antioxidantes ha sido el más estudiado. Los antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhabilitando la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. Podemos distinguir dos categorías: sintéticos y naturales. Los primeros son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los segundos pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides (Pastene, 2009)

Por otra parte los radicales libres se definen como cualquier especie química capaz de existir de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura, por lo tanto son altamente reactivos; también son conocidos como especies reactivas del oxígeno y especies reactivas del nitrógeno, (ROS y RNS, respectivamente por sus siglas en inglés). A bajas concentraciones son necesarios para el buen funcionamiento celular pueden actuar como segundos mensajeros estimulando la proliferación celular y/o actuando como mediadores para la activación de las células, sin embargo, un exceso de los mismos puede acumularse hasta niveles tóxicos dando como resultado que se produzcan diversas acciones sobre el metabolismo primario, que pueden producir daño oxidativo de macromoléculas biológicas como el DNA, lípidos, carbohidratos y proteínas. Estos participan en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades, tales como: cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares, procesos reumáticos, patologías gastroentéricas, afecciones broncopulmonares o procesos neurodegenerativos. También están implicados en procesos fisiológicos como el envejecimiento, el daño causado por el ejercicio físico agotador y otros.

Mecanismo de acción de los antioxidantes:

- Previniendo la formación de ROS.
- Interceptando el ataque de ROS.

- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas.
- Facilitando la reparación del daño causado por ROS.
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS. (Agudo, 2002)

La importancia de los polifenoles en salud humana ha sido ampliamente revisada. No obstante, uno de los aspectos críticos de la investigación sobre la capacidad antioxidante de productos naturales se relaciona con la elección de las herramientas de medición. Cada vez es necesario contar con una batería de ensayos que nos permitan obtener información complementaria. El uso de radicales estables coloreados como el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), Acido2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico (ABTS), o reactivos como el complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ); se recomiendan como criterio preliminar para jerarquizar las distintas plantas, extractos o fracciones de éstos, de acuerdo a su poder antioxidante. Dado que en los ensayos mencionados ocurren reacciones de transferencia de electrones y/o hidrógeno, el adecuado conocimiento de la química de tales sistemas es condición *sine qua non* para interpretar correctamente los resultados, particularmente cuando estos ensayos se aplican a muestras de fluidos biológicos. Como se puede apreciar en muchos estudios, los datos a menudo son cruzados con el contenido de polifenoles totales de las muestras, determinados como equivalentes de ácido gálico (GAE). Sin embargo, cada vez es más frecuente recurrir a técnicas de separación acopladas a sistemas de detección como el arreglo de diodos (DAD) o la espectrometría de masas (LC-MS). Dichas técnicas permiten diseccionar de mejor manera la actividad antioxidante y asignarla a un grupo específico de compuestos. Si bien es cierto, no existe una metodología que pueda ser considerada como un «*Gold Standard*», numerosos estudios consideran que ciertos ensayos como el ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), poseen ventajas comparativas respecto al resto. El índice ORAC permite combinar en un solo parámetro, información sobre la cinética de oxidación utilizando el área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia o absorbancia de una sonda como la fluoresceína (ORAC-FL) o el rojo de pirogalol (ORAC-PGR), la cual es desafiada por radicales peroxilo (AAPH). En el ensayo ORAC-FL los tiempos de inducción están fuertemente influenciados por el número de grupos fenólicos presentes en la muestra mientras

que, en el ensayo ORAC-PGR, dichos tiempos prácticamente no se observan y el decaimiento de la absorbancia se ve influenciado principalmente por la reactividad de los fenoles de la muestra. Recientemente, se ha planteado que ambos índices ORAC (FL y PGR) son complementarios y su relación es un mejor indicador de la calidad promedio de los antioxidantes de una muestra. El mismo grupo de investigadores, ha propuesto el ORAC-PRG como una forma rápida de determinar el contenido específico de vitamina C en extractos y fluidos biológicos, dado que esta sustancia es una de las pocas que genera tiempos de inducción en forma concentración-dependiente. En busca del «*Santo Grial metodológico*», y con el objetivo de ampliar su espectro de aplicación, varios refinamientos han sido introducidos a este ensayo. Por ejemplo, el uso de ciclodextrina metilada permite obtener el índice ORAC lipofílico en distintas muestras vegetales o fluidos biológicos.

Adicionalmente, el ensayo ha demostrado ser altamente versátil, debido a que en él se han introducido modificaciones que permiten medir el efecto de antioxidantes sobre otras especies reactivas del oxígeno y nitrógeno dando origen a variantes para el radical hidroxilo (HORAC), peroxinitrito (NORAC), anión superóxido (SORAC).

Paralelamente, otros investigadores han desarrollado un ensayo denominado CUPRAC (*Cupric ion reducing antioxidant capacity*), el cual se ha empleado para la determinación de la capacidad antioxidante de polifenoles, ácido ascórbico y tioles. El ensayo también se ha adaptado para al análisis de antioxidantes hidrofílicos como lipofílicos y en la determinación de la capacidad captadora de radical hidroxilo. Hace poco, el uso del índice ORAC como criterio de poder antioxidante ha sido empleado por la USDA (*United States Department of Agriculture*), la cual ha publicado una serie de tablas con la composición antioxidante de alimentos y plantas medicinales de uso en Norteamérica (Pastene, 2009).

Existe evidencia de que los compuestos con actividad antioxidante están relacionados con actividad antiproliferativa de células tumorales y cancerígenas (Bonofiglio, Giordano, De Amicis, Lanzino & Ando, 2016; Caselli, Cirri, Santi & Paoli, 2016; Formagio et al., 2015; Jahanban-Esfahlan, Modaeinama, Abasi, Abbasi & Jahanban-Esfahlan, 2015; Salim, Abd El-Magid, Farara & Maria, 2015). Las medidas de la actividad antirradical se pueden realizar mediante dos estrategias distintas, en función de la información que se desea obtener:

Determinación directa: El radical se emplea como un factor de cuantificación (produce una señal analítica). La adición del antioxidante, antes o después de la generación del radical, provoca una disminución de la señal. En el ensayo de post-adición se forma el radical en ausencia de la muestra y así, cuando se añade la sustancia antioxidante se produce un descenso en la señal debido a la disminución de la concentración del radical. En ensayos de inhibición, la muestra se añade a los sustratos de oxidación antes que sea generado el radical, la reacción comienza con la adición del oxidante (ABTS^{•+}, DPPH, entre otros).

Determinación indirecta: La presencia de radicales libres produce la pérdida o aparición de un reactivo, y por tanto, en presencia de un antioxidante se provoca el aumento o disminución de la señal (métodos ORAC, FRAP, entre otros).

2.2. Métodos para evaluar la actividad antioxidante

2.2.1. DPPH

La capacidad antioxidante medida como la capacidad captadora de radicales libres se determina cualitativamente por el método DPPH.

Desarrollo del método

El ensayo estandarizado

Se toma una alícuota de 100 μ L de solución en metanol de la muestra a tres concentraciones distintas (150, 100 y 50 mg/L)

Se adicionan 900 μ L de DPPH en solución metanólica de concentración 60 mg/L y se mezclan.

Se incuban los tubos de reacción por 30 min en oscuridad.

Se mide la densidad óptica a 517 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Se utiliza como control positivo ácido ascórbico y ácido gálico en solución metanólica 100, 50 y 10 mg/L. (por triplicado)

Se determina el porcentaje de inhibición del radical DPPH con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición del DPPH} = \frac{A_{\text{Blanco}} - A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Blanco}}} \times 100 \quad (1)$$

Ecuación 1. Determinación del porcentaje de inhibición del radical DPPH

Dónde: A es la absorbancia.

Una vez que se determina el valor del porcentaje de inhibición de cada una de las concentraciones, se procede a realizar una regresión lineal con dichos valores, de tal manera se obtiene la siguiente ecuación:

$$y = mx + b \quad (2)$$

Ecuación 2. Ecuación de la recta

Para calcular la IC_{50} se debe remplazar, el valor correspondiente al 50% de inhibición del DPPH en el eje «y» y en el eje «x» la concentración de antioxidante necesaria para inhibir en un 50% el DPPH (Plazas-Gonzalez, 2015).



Figura 1. Reacción del radical DPPH, de izquierda a derecha se presenta los tubos de menor a mayor concentración del agente antioxidante. Color morado DPPH Oxidado, color amarillo DPPH reducido

2.2.2. Método de captación del radical ABTS^{•+}

La determinación de captación del radical ABTS^{•+} fue establecida por (Re et al., 1999).

Primeramente se forma el radical ABTS^{•+} tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (2.45 mM,) incubados a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 h.

Una vez formado el radical ABTS^{•+} se diluye con etanol hasta obtener una densidad óptica (DO) de 0.700 ± 0.200 a 734 nm.

Se colocan 1980 μ L del radical libre en tubos de vidrio y se hacen reaccionar con 20 μ L de las soluciones de los extractos a concentraciones de 3.15 a 50 μ g/mL.

Se mide la DO de la mezcla de reacción al minuto 1 y al 6 a 734 nm, los ensayos se realizan por triplicado.

Se realiza la curva de calibración con TROLOX con concentraciones de 15 a 3 mM, y se determina el porcentaje de inhibición utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{(A_{\text{inicial}}) - (A_{\text{final}})}{(A_{\text{inicial}})} \times 100 \quad (3)$$

Ecuación 3. Determinación del porcentaje de inhibición de radicales libres con TROLOX

Con los datos obtenidos se calcula la Concentración Inhibitoria 50 (IC₅₀) por medio del paquete estadístico SPSS a través de un análisis Probit, posteriormente se determina la Actividad Equivalente de Trolox (TEAC) con la ecuación (García Hernández, 2016; Mhadhebi, Mhadhebi, Robert & Bouraoui, 2014):

$$TEAC \left(\text{TROLOX} \frac{\text{mg}}{100 \text{ g planta}} \right) = \frac{IC_{50} \text{ Trolox}}{IC_{50} \text{ muestra}} \times 100 \quad (4)$$

Ecuación 4. Determinación de la Actividad Equivalente de Trolox (TEAC)

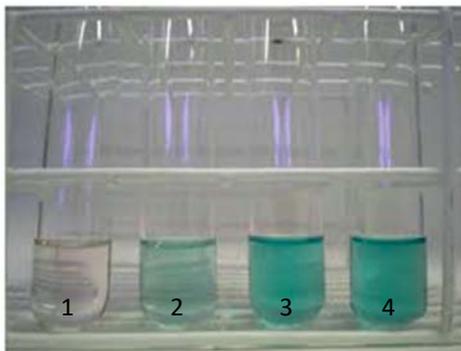


Figura 2. Reacción del radical $ABTS^{+}$ frente a TROLOX 15 mM a diferente tiempo de reacción.
1) 6 min; 2) 3 min; 3) 0 min; 4) Solución de $ABTS^{+}$ sin Trolox

2.2.3. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

El método ORAC consiste en medir la disminución en la fluorescencia de una proteína como resultado de la pérdida de su conformación cuando sufre daño oxidativo causado por una fuente de radicales peróxido (ROO). El método evalúa la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger la proteína del daño oxidativo.

Desarrollo del método

Se pesan 5 mg de TROLOX y depositan con 10 mL de una solución buffer de fosfato 10 mM en matraz de aforación; solubilizarlos completamente (calentar para disolver completamente).

A partir de esta solución, se realizan las diluciones respectivas para la curva de TROLOX tomando 5, 12.5, 25, 50, 75, 100 μ L y llevándolos a volumen de 1 mL con agua destilada. Curva 10–200 μ g/mL.

En una microplaca adicionar ordenadamente en cada pozo los siguientes componentes: 150 μ L de fluoresceína 1 μ M, 25 μ L de la dilución respectiva de TROLOX.

Paralelamente preparar un blanco de ensayo que contenga: 150 μ L de fluoresceína 1 μ M y 25 μ L de solución buffer fosfato 10 mM.

Preincubar la microplaca durante 30 min a 37°C.

Adicionar a cada pozo 25 µL de solución de AAPH 250 mM.

Leer la intensidad de la fluorescencia cada 2 min durante 2 h a una longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm respectivamente.

La protección del antioxidante se mide a partir del área de fluorescencia bajo la curva (AUC) de la muestra en comparación con la AUC del blanco, donde el antioxidante no está presente. La AUC se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$AUC \left(0.5 + \left(\sum_{i=1}^{i=31} \frac{f_i}{f_1} \right) \right) CT \quad (5)$$

Ecuación 5. Determinación del área bajo la curva que representa la protección del antioxidante

Donde:

I = número de ciclos

F = unidades de fluorescencia

CT = tiempo de cada ciclo en min. En este caso, $CT = 2$

El área limpia bajo la curva (AUC limpia) se encuentra por diferencia entre el AUC de la muestra y el AUC del blanco. Esta AUC limpia (y) se representa delante de la concentración de Trolox como patrón (X) obteniendo la recta de regresión lineal, a partir de aquí, se calculan los moles equivalentes de Trolox (ET) por litro de muestra a partir de la siguiente ecuación:

$$ORAC = \frac{ABC_{AH}}{ABC_{Trolox}} \times \frac{[Trolox]}{[AH]} \quad (6)$$

Ecuación 6. Determinación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

Donde:

ABC_{AH} = Área bajo la curva en presencia de antioxidante.

ABC_{Trolox} = Área bajo la curva de Trolox.

$[Trolox]$ = Concentración de Trolox.

$[AH]$ = Concentración de Antioxidante. (Alvarez et al., 2012)

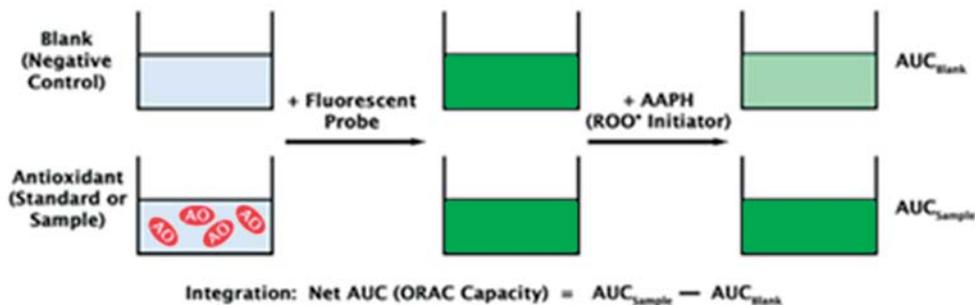


Figura 3. Diagrama de flujo para la reacción de ORAC en presencia de fluoresceína (Cellbiolabs, 2016)

2.2.4. Método FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)

Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} que es menos antioxidante. El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado.

Se mide la DO del Fe^{2+} . Así, cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de Fe^{2+} y más alta la señal de absorbancia. El complejo va a poder ser reducido por productos con potenciales redox menores a 0.7 V (potencial redox del Fe^{3+} -TPTZ).

Debido a que el potencial redox del Fe^{3+} -TPTZ es comparable con el del ABTS se pueden analizar compuestos similares con ambos métodos aunque las condiciones de la reacción sean distintas. El mecanismo del FRAP es de transferencia de electrones, a diferencia de otros métodos donde se produce captura de radicales libres, según esto, el FRAP puede ser útil, en combinación con otros métodos, en la determinación de la capacidad antioxidante de productos que contengan distintos tipos de antioxidantes.

Desarrollo del método

Preparar un *buffer* ácido acético-acetato de sodio 0.3 mM (pH 3.4)

Solución de ácido clorhídrico (HCl) 40 mM. Diluir 535 μL de HCl (37%) en 100 mL de agua destilada.

Solución TPTZ 10 mM. Pesar 0.0312 g del reactivo TPTZ y disolverlos en un matraz de 10 mL con HCl 40 mM.

Solución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM. Disolver 0.1352 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 25 mL de agua destilada.

Preparar solución de trabajo diario FRAP, esta solución de trabajo deberá de prepararse diariamente. Mezclar 900 μL de solución TPTZ con 2.5 mL de solución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM y 25 mL de tampón acetato (mantenerse en baño a 37 °C).

En una placa de 96 pozos agregar 300 μL de la solución de trabajo, agregar 10 μL de la muestra y 30 μL de agua destilada (dilución final 1:34).

Leer la DO a 593 nm y se deja reaccionar por 1 h y después se determina la DO final a la longitud de onda antes mencionada. Para cada muestra se tiene en cuenta la lectura de la absorbancia del blanco sin cromóforo, de la misma manera que en las pruebas anteriores.

La curva de calibración se construye usando TROLOX como control positivo (3.99 mM). La solución madre se prepara disolviendo 0.01g de Trolox en 5 mL de metanol y 5 mL de agua destilada. A partir de esta solución se hacen diluciones que serán los distintos puntos de la recta, con concentraciones de 79, 119, 159, 199, 239, 279, 319, 359 y 399 μM , bajo el mismo criterio antes mencionado.

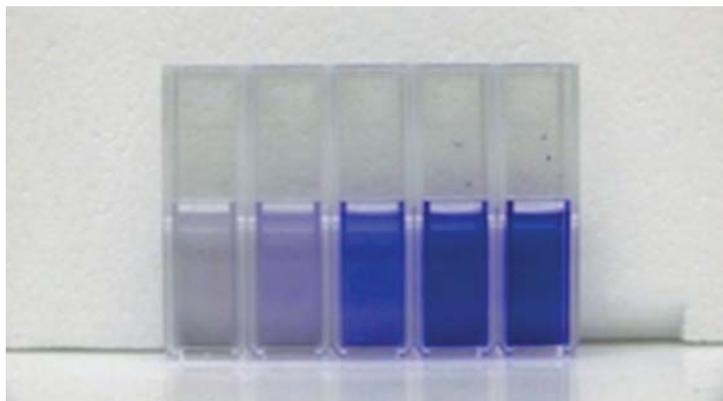


Figura 4. Reacción de FRAP, a diferentes concentraciones del agente antioxidante. De derecha a izquierda reacción de reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} de menor a mayor concentración

Las actividades de las muestras se expresan como TEAC. Se determina la IC_{50} mediante un análisis de Probit (véase Ecuación 4) (Agudo, 2002; Benzie & Strain, 1996).

2.2.5. Contenido de Fenoles totales método de Folin-Ciocalteu

Se determina la capacidad que tienen los polifenoles para reducir el Mo (VI) a Mo (V), como resultado de tal reacción, el reactivo de color amarillo adquiere un intenso color azul que se mide con el espectrofotómetro.

Desarrollo del método

Se prepara una disolución patrón de ácido gálico de 0.1 g/L, 25 mg de ácido gálico, y aforar en un matraz de 25 mL con agua destilada, enseguida se prepara una dilución 1:10 con agua destilada (recién preparada).

Preparar una disolución de carbonato de sodio al 20% pesando 5 g de carbonato de sodio en un matraz de aforación de 25 mL, inicialmente se disuelven en 15 mL de agua grado HPLC y se lleva a ultrasonido hasta su completa disolución, finalmente se lleva a su volumen de aforo con agua.

Preparar una disolución 1 N del reactivo de Folin-Ciocalteu, por medio de una dilución 1:2 del reactivo comercial (2 N) en agua destilada; el reactivo se protege de la luz y se refrigera hasta su uso.

A partir de la disolución patrón de ácido gálico, en viales protegidos de la luz, se hacen las diluciones necesarias con agua destilada para obtener concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mg/L para la preparación de la curva de calibración. Esto se realiza tomando respectivamente 20, 40, 60, 80 y 100 μ L de la disolución patrón de ácido gálico de 0.1 g/L en viales ámbar de 3 mL.

Adicionar a cada vial, 250 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N, se agita durante 5 min en el ultrasonido, posteriormente se adicionan 1 250 μ L de la disolución de carbonato de sodio al 20% a cada vial, se lleva a un volumen final de 2 mL con agua destilada y se deja reposar por 2 h. También se prepara un blanco con todos los componentes excepto la disolución de ácido gálico.

Finalmente se lee la DO a 760 nm en un espectrofotómetro de ultravioleta-visible.

El contenido de fenoles de cada extracto se expresa en mg/g de peso seco de la planta, basándose en la curva de calibración del material de referencia de ácido gálico, de ahí que se utilice el término «Unidades de ácido gálico equivalentes por gramo de extracto o materia vegetal desecada».

2.2.5.1. Determinación del contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determina mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se toman 2 mg de cada extracto en un matraz Erlenmeyer y se les agrega 50 mL de agua destilada y se agita.

Tomar 0.5 mL de cada una de estas disoluciones y se mezclan con 0.75 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu dejando en reposo a temperatura ambiente por 5 min después de lo cual se agregan 0.75 mL de carbonato de sodio al 20%.

Se agitan fuertemente y se deja reposar durante 90 min a temperatura ambiente.

Después de este tiempo se mide la DO a 760 nm. Este procedimiento se realiza con cada una de las plantas objeto de estudio por triplicado (Gutiérrez-Avella, García-Ortiz & Mendoza-Cisneros, 2008).

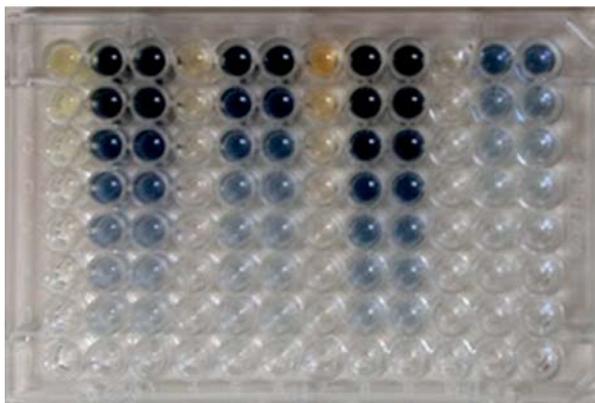


Figura 5. Microplaca que muestra la coloración del reactivo de Folin-Ciocalteu a diferentes concentraciones de polifenoles

2.3. Toxicidad

Las plantas medicinales producen una gran cantidad de compuestos bioactivos que han sido utilizados para combatir enfermedades, desde un simple resfriado hasta el cáncer, en décadas pasadas la industria farmacéutica realizó su búsqueda en compuestos sintetizados químicamente, pero dichos compuestos presentaron efectos secundarios considerables que en ocasiones más nocivos que la enfermedad que combaten, produciendo perjuicio en órganos como hígado, riñones y páncreas, entre otros. Por tal motivo es relevante conocer si los compuestos bioactivos extraídos de las plantas presentan toxicidad, en la actualidad se sabe que el 80% de la población utiliza las plantas para su atención primaria, en general la gente que utiliza las plantas creen que por ser de origen natural y no un compuesto sintetizado en un laboratorio son amigables con el organismo, sin embargo algunos de estos compuestos son altamente tóxicos, por lo antes mencionado es de vital importancia determinar la toxicidad de los extractos de plantas para validar su uso seguro. No se puede diferenciar con precisión en lo que se refiere a toxicidad, ya que está íntimamente relacionada con la dosis administrada. De antemano, una planta que contiene sustancias con actividad relevante, puede administrarse a concentraciones medicinales, convirtiéndose en un remedio muy beneficioso para el ser humano. Aunado a esto si se conoce la toxicidad se puede determinar el índice terapéutico del extracto o compuesto para utilizarlo con dosis subtóxicas. El Índice Terapéutico refleja la seguridad relativa de un medicamento o compuesto en su selectividad de acción. Casi siempre se calcula a partir de las curvas de dosis-efecto obtenidas en animales de experimentación y generalmente, se refiere a la relación de las DL_{50}/DE_{50} , o sea, la razón de la dosis letal en 50% de la población y la dosis requerida para producir el efecto terapéutico deseado en 50% de esta población. Es importante diferenciar entre seguridad y toxicidad de un medicamento, ya que la toxicidad es una característica intrínseca del medicamento, en tanto, la seguridad es una función del medicamento y de las condiciones de uso.

La toxicidad aguda describe los efectos adversos que son el resultado de una sola exposición a una sustancia, esto difiere de la toxicidad crónica que refiere la acción tóxica de la sustancia en exposiciones repetidas en un periodo de tiempo más largo (meses a años).

Existen dos modos principales a través de los cuales pueden ejercer los productos químicos su toxicidad. Los efectos locales tienen lugar en la zona del cuerpo

que ha estado en contacto con el producto. Los efectos sistémicos tienen lugar después o una vez que el producto se ha absorbido y distribuido desde el punto por el que penetró hasta otras zonas del organismo. Casi todos los compuestos causan efectos sistémicos, aunque algunos pueden causar ambos.

En la actualidad, la toxicología alcanza enorme trascendencia social debido al importante número de sustancias químicas comercializadas y su posible impacto sobre la salud pública y ambiental. Ello ha conducido al desarrollo de estrategias de evaluación de riesgos con fines normativos: es el caso de la llamada «toxicología reguladora». Por ende es de vital importancia que los profesionales en esta rama de la toxicología experimental conozcan los métodos abreviados que existen hoy en el mundo para evaluar la toxicidad aguda de un producto, los cuales en su momento se crearon para cumplir con el principio de las 3 «R» (Reducción, Refinamiento y Reemplazo), y de esta forma trata de utilizar la menor cantidad de animales posibles y que la muerte no fuese el objetivo fundamental de este tipo de investigación sino la aparición de la llamada toxicidad evidente o signos y síntomas de toxicidad como criterio de punto final (endpoint) de su protocolo de trabajo de investigación (Arencibia-Arrebola et al., 2003).

Es así que los métodos *in vitro* ocupan la primera línea para la búsqueda de nuevas moléculas con potencial biológico que no presenten toxicidad aguda para el establecimiento de éstas como medicamentos de patente. En este capítulo describiremos técnicas para la determinación de toxicidad en distintos modelos de organismos.

2.3.1. Métodos para evaluar la toxicidad

2.3.1.1. Ensayo de letalidad en *Artemia salina*

Este ensayo se utilizó inicialmente para la pre-evaluación de extractos vegetales con compuestos antitumorales y se determinó una correlación positiva entre la mortalidad de las larvas de artemia y la citotoxicidad frente a las células 9KB.

A. salina son crustaceos diminutos de cuerpo blando, comúnmente comercializados como quistes en tiendas de mascotas como alimento para peces, por lo tanto ofrece ventajas tales como: disponibilidad, bajo costo, facilidad de almace-

namiento, los ensayos pueden realizarse prácticamente en cualquier momento y los requerimientos para este ensayo son mínimos.

El fundamento de este ensayo se basa en la habilidad de un extracto o compuesto de ser tóxico para las artemias cultivadas en el laboratorio (Carballo, Hernandez-Inda, Perez & Garcia-Gravalos, 2002), se utiliza para la evaluación preliminar de la toxicidad (Solis, Wright, Anderson, Gupta & Phillipson, 1993), detección de toxinas fúngicas (Harwig & Scott, 1971), toxicidad de extractos de plantas (McLaughlin, 1991), metales pesados (Martínez, Ramo, Torreblanca & Díaz-Mayans, 1999), toxinas de cianobacterias (Jaki, Orjala, Bürgi & Sticher, 2008), pesticidas (Barahona & Sánchez-Fortún, 1999), y en el ensayo de toxicidad de materiales dentales (Pelka, Danzl, Distler & Petschelt, 2000).

Desarrollo del método

Se atemperan unas horas los quistes de *A. salina* y se pesan 0.1 g.

Se depositan en 300 mL agua de mar sintética (40 g de sal de mar, 6 mg de levadura de cerveza, ajustar a pH 7.8, aforar a 1 L) en una cámara de eclosión, con un lado oscuro y otro iluminado (bombilla eléctrica de 20 W), dividida con un pequeño orificio, se mantiene por 24 h con aeración constante a 22-29 °C.

Las artemias eclosionadas se separan y mantienen a las mismas condiciones por 48 h.

Se colocan una microplaca de 96 pozos con 100 µL de agua de mar en cada pozo más 10 nauplios, se depositan 100 µL de los extractos para tener una concentración final de 100, 250, 500, 750 y 1000 µg/mL y como control negativo agua de mar artificial y positivo KMnO_4 a 400 µg/mL, se incuban a las mismas condiciones por 24 h.

Se cuentan los nauplios muertos con ayuda de un estereoscopio y se hace el análisis estadístico PROBIT para determinar la DL_{50} (McLaughlin, 1991). El criterio de toxicidad es el establecido por (Déciga-Campos et al., 2007) se consideran: valores superiores a 1000 µg/mL como no tóxicos, los menores de 1000 pero mayores de 500 µg/mL ligeramente tóxicos y los menores a 500 µg/mL tóxicos.



Figura 6. Diagrama de flujo para el ensayo de letalidad con *A. salina*

2.3.1.2. Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

El género *Daphnia* se ubica dentro del orden cladóceros de la clase crustácea, y especies como *D. magna*, *D. pulex*, y *D. similis*, son utilizadas extensivamente en pruebas de toxicidad. Los ensayos de toxicidad con *D. magna*, permiten determinar la letalidad potencial de sustancias puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, y agua de poro de sedimentos, entre otros (Aoki M, Encarnación-Dimayuga & Cortés A, 2005; Díaz-Báez, Granados & Ronco, 2008).

Desarrollo del método

La toxicidad aguda con individuos de *D. magna* mediante la determinación de la inhibición de la movilidad (IC_{50} 24 h). Primero se realizan ensayos preliminares para determinar el rango del efecto tóxico. Una vez establecido este rango se realizan las pruebas definitivas con al menos 5 concentraciones en progresión geométrica, con un porcentaje de inmovilidad (mortalidad) entre un 0 y 100%.

Previamente se cultivan los individuos de *D. magna* a 24 h de nacidos

Se colocan en recipientes de vidrio de 25 mL como cámaras experimentales 20 neonatos de *D. magna*, divididos en 5 individuos por réplica, estos se exponen a 10 mL a diferentes concentraciones de la sustancia a evaluar y se mantienen sin alimentación por 24 h a $20^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$; utilizando dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) como tóxico de referencia.

Se contabiliza el número de organismos inmóviles, presumiéndose su muerte, en caso de duda se recomienda agitar bien el frasco de experimentación para verificar la inmovilidad de los organismos afectados (muertos).

Los resultados obtenidos se analizan utilizando un método paramétrico para el cálculo de los valores de CL_{50} a 24 h y su intervalo de confianza mediante el programa estadístico Probit

2.3.1.3. *Ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla *Allium cepa* L*

En este ensayo mediante la inhibición del crecimiento promedio de raíces. Cuando un bulbo de cebolla (*Allium* sp.) se rehidrata se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemos radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. El efecto puede determinarse en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas al compuesto tóxico contra la de cebollas no expuestas, después de 72 h de exposición. El cálculo se realiza estableciendo el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces respecto a la longitud promedio de las raíces del control (Báez-Díaz, Ronco & Pica-Granados, 2008).

Desarrollo del método

Se seleccionan bulbos de *Allium* sp. (cebolla amarilla) de 1.5 cm de diámetro, secos y sin formación de hojas o raíz, se limpian eliminando la epidermis seca y removiendo, con un bisturí o instrumento punzante, se colocan en agua destilada por 2 h y dejar secar.

En tubos de ensayo de 10×1.5 cm se depositan de 15–20 mL de las soluciones a 5 concentraciones diferentes de la muestra a evaluar, un control negativo (agua dura) y un control positivo (Solución Cu^{+2}), las soluciones deben de llegar al borde del tubo, se colocan los bulbos en la boca del tubo procurando la zona radicular quede inmersa en el líquido (10 repeticiones)

Los tubos se colocan en una gradilla a temperatura ambiente (20°C) durante un período de 72 h. Debe evitarse la iluminación directa y mantener el nivel de la solución del tubo con ayuda de una pipeta Pasteur.

Se mide la longitud de las raíces, con una regla común con escala en milímetros.

Se obtiene el promedio de las 10 repeticiones. (Descarte valores extremos).

Registro de signos de fitotoxicidad: Disminución de la longitud de las raíces, Medición de elongación.

El porcentaje de efecto de inhibición se calcula por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ efecto de inhibición} = \left(\frac{\text{long. del control} - \text{long. de la muestra}}{\text{long. del control}} \right) \quad (7)$$

Ecuación 7. Porcentaje del efecto de inhibición del crecimiento radicular

Con los valores obtenidos se construye una gráfica de concentración en función del porcentaje de inhibición y se calcula la CI_{50} mediante cualquiera de los siguientes métodos: Probit, promedios móviles o Sperman y Karber.

2.3.1.4. *Ensayo de toxicidad aguda con el cnidario Hydra attenuata*

La especie *H. attenuata* es empleada como organismo de prueba por la facilidad de su cultivo en laboratorio, su rápida reproducción, su estructura primaria (ectodermo, mesodermo y endodermo), que favorece el intercambio intra e intercelular y su potencial para la detección de compuestos tóxicos, así como por presentar cambios morfológicos fácilmente reconocibles bajo condiciones progresivas de intoxicación. Los pólipos de agua dulce del género *Hydra* son microinvertebrados de la clase Hydrozoa de amplia distribución geográfica. Se caracterizan por ser animales pluricelulares, cuyas células se disponen en dos capas: la epidermis y la gastrodermis, separadas por una mesoglea gelatinosa, la cual encierra una cavidad digestiva continua que se comunica directamente con el exterior a través de una abertura o boca. Algunas de las células intersticiales de la epidermis dan origen a los órganos característicos de defensa y ataque.

Los ensayos de toxicidad con *H. attenuata* permiten determinar subletalidad y letalidad potencial de sustancias puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros. Las pruebas de toxicidad con *H. attenuata* tienen una duración máxima de 96 h, tiempo durante el cual los organismos son expuestos al compuesto tóxico o muestra problema. Durante el ensayo, diariamente se hace

un examen microscópico y se registra los cambios morfológicos producidos. La exposición de los organismos a compuestos tóxicos da lugar a una serie de cambios morfológicos (efectos subletales) y dependiendo de la concentración, puede producir la muerte de los individuos (efectos letales). Los resultados de las pruebas permiten además de la estimación de la CL_{50} y la CE_{50} , establecer la LOEC (efectos letales), la NOEC (efectos subletales) y la concentración umbral de efectos observables (Threshold Observable Effect Concentration, TOEC) (Granados, Ronco & Baez-Díaz, 2008)

Desarrollo del método

Primero se establece el cultivo de *H. attenuata*: Temperatura 21 ± 2 °C, Fotoperiodo 16 h luz: 8 oscuridad luz Fluorescente, blanco-frío Intensidad luminosa < 800 . Recipientes de mantenimiento Circulares de vidrio de 20 cm de diámetro de fondo plano, cubiertos con un vidrio o papel que se permita la entrada de aire. La alimentación de los organismos por 4 d/semana con nauplios de *Artemia sp.*, desinfectados con solución yodada.

Se evalúa la salud de las hidras y el desarrollo del cultivo están en condiciones óptimas por medio de la tasa de crecimiento del cultivo.

Se selecciona un grupo de organismos mantenidos sin alimentación durante 24 h. Se elimina el medio de cultivo invirtiendo el recipiente y descartando el líquido, los organismos permanecerán adheridos al fondo del recipiente.

Se adiciona un volumen de medio de cultivo sin EDTA. Se resuspenden los organismos y se concentran en el centro del recipiente.

Se colocan las hidras en un recipiente de 10 cm de diámetro con medio de cultivo sin EDTA y, con la ayuda de una pipeta Pasteur, se transfieren de 10 a 15 organismos a cada una de las cajas Petri.

En una microplaca de cultivo celular de 12 pozos, se depositan 3 hidras en cada pozo, evitando aquellas que presenten yemas, se adicionan 4 mL de cada concentración de la muestra, control positivo (Cr (VI) a partir de dicromato de potasio) y control negativo (agua dura), se realiza por triplicado. En paralelo, se adiciona un volumen de 3 a 4 mL de cada solución en cajas Petri de 35×10 mm. Se incuban a las condiciones antes mencionadas por un período de 96 h.

Cada 24 h se realiza la observación de los organismos con la ayuda de un microscopio estereoscópico o lentillas de acercamiento con capacidad de 6 a 10X. Al terminar la revisión diaria, se suma el número total de hidras que presentan el mismo estado morfológico en los tres pozos correspondientes a cada dilución.

Con los resultados, se forman tres grupos: el primero definido por el número de hidras normales, el segundo con organismos que presentan efectos reversibles (número de bulbos + número de cortas) y el tercero con organismos que presentan efectos irreversibles (número de tulipanes + número de desintegradas).

Se calcula el porcentaje de efecto subletal y letal. El primero se calcula a partir de la suma del número de organismos que presentan anomalías en su morfología, ya sea del tipo reversible o irreversible, y el segundo se obtiene a partir del número de organismos con anomalías exclusivamente irreversibles. Con estos datos se estiman los valores de CE_{50} o de CL_{50} , mediante los métodos estadísticos Probit, promedios móviles o Sperman y Karber, así como los valores de la LOEC, NOEC, y TOEC. Este último se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$TOEC = (NOEC \times LOEC)^{1/2} \quad (8)$$

Ecuación 8. Determinación de la concentración umbral de efectos observables

2.3.1.5. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 h de exposición) en el que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Se evalúan los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo. En la incorporación de esta prueba en una batería de bioensayos es importante considerar el compromiso entre la sensibilidad de la especie *L. sativa*, el reducido tiempo de exposición de la prueba con semillas, los bajos costos asociados y que no requiere equipamiento sofisticado, en particular en la aplicación a muestras ambientales o en el monitoreo de procesos de detoxificación, saneamiento, control de efluentes o reúso de biosólidos (Sobrero & Ronco, 2004).

Desarrollo del método

Se recomienda primero realizar un ensayo preliminar de las sustancias a evaluar, utilizando diluciones logarítmicas (100, 10, 1, 0.1, 0.01) que permitan establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 y 0%, necesarios para calcular la CI_{50} .

Colocar en cada caja Petri un disco de papel de filtro (Indicar: la dilución correspondiente, fecha, hora de inicio y término del bioensayo). Saturar el papel de filtro con 4 o 5 mL de la dilución evitando que se formen bolsas de aire con la ayuda de una pinza, colocar cuidadosamente 20 semillas, dejando espacio suficiente entre las semillas para permitir la elongación de las raíces. Tapar las cápsulas y colocarlas en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad, cubrir las cajas de Petri de la luz inmediatamente después de colocar las semillas en su interior y durante el período de ensayo (por triplicado)

Incubar por 120 h (5 d) a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$

Se mide el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula y del hipocotilo con una regla o papel milimetrado, medir cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocotilo de cada una de las plántulas, de todos los tratamientos. La medida de elongación de la radícula se considera desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocotilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocotilo se considera desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones.

Observación detallada del estado general de las mismas y del crecimiento de la radícula sobre el papel de filtro (ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes poco desarrollados, radículas con crecimiento ensortijado, necrosis en los cotiledones, etc.). La necrosis (presencia de tejido muerto).

Para facilitar la medición de la radícula e hipocotilo, se procede a congelar las cajas Petri correspondientes a todos los tratamientos y descongelarlas a medida que se van midiendo (no conservar el material luego de ser descongelado).

Se realizan los siguientes cálculos:

Promedio y desviación estándar de la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas.

Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocotilo con el promedio de elongación respecto del promedio de elongación del control negativo.

Porcentaje de inhibición en la germinación.

Con los datos anteriores, se elabora la gráfica dosis-respuesta, colocando en la ordenada el porcentaje de inhibición y en la abscisa la concentración.

Mediante un método gráfico o el uso de programas estadísticos, se calcula la concentración que produce el 50% de inhibición (CI_{50}/CE_{50})

Para el caso de muestras en donde la inhibición es inferior al 50%, o para determinar el valor correspondiente al NOEC o LOEC, se realiza el análisis de comparación de medias (t Student, Dunnett) para verificar la significancia estadística en el porcentaje de efecto.

2.3.1.6. *Ensayo de toxicidad con el nematodo Panagrellus redivivus*

El nematodo de la especie *P. redivivus* es un organismo de prueba aplicable al biomonitoreo de aguas y sedimentos. Se ha usado para la detección de toxicidad de muestras ambientales complejas como son aguas residuales, suelos, sedimentos y lodos contaminados, ya sea a través del análisis de fracciones químicas obtenidas a partir del pretratamiento de muestras o de la obtención de elutriados o extractos.

P. redivivus es una especie dioica y ovovivípara. El primer estadio de desarrollo ocurre en el útero de las hembras y es denominado como J1, en el que se desarrolla la embriogénesis con una duración aproximada de 20 h. Cuando el estadio J1 muda da lugar a los juveniles o J2, que emergen del huevo y son expulsados por la vulva de la hembra como libres nadadores. Los recién nacidos (J2) continúan su crecimiento pasando por otros dos estadios juveniles, J3 y J4, hasta alcanzar el estado adulto a las 96 h de su nacimiento. Cada estadio se caracteriza por la longitud del organismo, ámbito que está bien definido para *P. redivivus*. Sin embargo, bajo condiciones adversas del medio de vida, los organismos responden ya sea muriendo o mostrando alteraciones en su periodo de desarrollo. Estas manifestaciones de efecto se determinan por el monitoreo

del crecimiento de una población de 100 organismos en estadio J2 a lo largo de un periodo de 96 h. A partir de su seguimiento es posible determinar efectos letales, a través del número de organismos muertos. Asimismo, se pueden observar efectos subletales crónicos y de genotoxicidad, a través del número de organismos estancados en etapas retardadas de desarrollo (J2, J3 y J4) o, en caso de alcanzar etapas adultas, también se pueden evaluar efectos de mayor escala temporal por el número de hembras grávidas y el número de sus huevos (Granados, 2008).

Desarrollo del método

Se realiza un cultivo de *P. redivivus* en frascos con medio de harina-agua, el cual se inocula con una pequeña población con una pipeta Pasteur. Después de algunos días los enjambres de nemátodos pueden ser observados en las paredes del frasco, al reproducirse y hacerse visibles en la tapa de la caja Petri de donde pueden lavarse con buffer M9 para obtener las hembras, sin arrastrar restos de harina que interfieran en la prueba.

24 h antes de cada prueba se separan las hembras y se inoculan en placas de cultivo con medio agar-agua que contiene también colesterol (animales J2 en un estado fisiológico similar).

Los nemátodos de un cultivo stock en caja Petri son inundados con buffer M9 y son pasados a través de un tamiz, quedan los organismos de mayor tamaño, los cuáles se recuperan mediante un enjuague con buffer M9 sobre una placa fresca de agar a una profundidad no mayor de 2 a 4 mm de buffer. Dentro de estos adultos separados habrá muchas hembras grávidas. Estas hembras producirán de 10 a 20 organismos J2 en un período de 12 h. Al siguiente día, se tamizan nuevamente los organismos y se lavan con medio M9, pero ahora los organismos que se utilizan son los que pasan por el tamiz. Esta progenie definida en estado J2 será usada. Se lavan con buffer M9, a temperatura ambiente.

Preparación de diluciones de muestras problema para muestras problema líquidas (agua, extractos orgánicos y elutriados) se preparan alícuotas de 10 mL diluidas en medio M9Y. Para muestras acuosas (10%) se adiciona: 1.0 mL de muestra + 9.0 mL de medio M9Y. Para extracto orgánico en metanol (3%) se adiciona: 0.3 mL de extracto orgánico de la muestra en 9.7 mL de medio M9Y. Para extrac-

to orgánico en dimetilsulfóxido (1%) se adiciona: 0.1 mL de extracto orgánico de la muestra + 9.9 mL de medio M9Y.

Cada una de las diluciones preparadas se distribuye en volúmenes de 0.5 mL en 10 vasos pequeños de vidrio o materiales plásticos no tóxicos, de fondo plano, de aproximadamente 1 cm de diámetro y capacidad de 2.5 mL.

Bajo el microscopio se toman 10 nemátodos J2 con la ayuda de una micropipeta Drummond con capilar y punta (Eppendor loader tips) y se colocan dentro de los recipientes sobre las soluciones de prueba. Que la gota en que se tomen a los nemátodos sea lo más pequeña posible a fin de afectar lo menos posible la concentración.

Se debe correr un blanco con las soluciones involucradas en el mismo (agua, metanol, dimetilsulfóxido), se diluye en medio M9Y en la misma relación (v/v) empleada en la preparación de las muestras problema, un control negativo con medio M9Y y un control positivo con soluciones del compuesto tóxico de referencia (Zn (II) preparadas a partir de sulfato de zinc) a 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 mg/L. Los animales se dejan crecer en los recipientes bien tapados durante 96 h a 20 ± 2 °C.

Los recipientes se abren y se registra el número de sobrevivientes en cada vaso. Posteriormente, se tapan de nuevo y se colocan en agua caliente a 60 °C por unos minutos, el calor mata a los nemátodos y provoca su estiramiento y una mejor apreciación de su tamaño. La revisión y medición de cada organismo puede efectuarse en este momento u optar también por aplicar tinción, preferentemente con una gota de rosa de bengala (0.5 g/L) o con otros colorantes como azul-algodón-lactofenol o azul de metileno. La longitud debe determinarse de forma inmediata midiendo a través de un microscopio con reglilla ocular. Se recomienda hacer la medición a un aumento de 1.6X. Se registra el número de animales en cada estadio.

Los efectos sobre la sobrevivencia, el crecimiento y la maduración de la población expuesta a muestras problema son expresados como porcentajes, en relación a los valores obtenidos para estos mismos parámetros en la población del control.

El porcentaje de sobrevivientes en la población expuesta a una muestra que se sospecha tóxica, en relación a los sobrevivientes de la población control. Se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$S = 100 \times \frac{ST}{SC} \quad (9)$$

Ecuación 9. Determinación de organismos sobrevivientes frente al agente químico

Donde:

S = sobrevivencia

ST = número de sobrevivientes de la prueba

SC = número de sobrevivientes del control

Para ver si es significativamente distinta respecto a la del control se calcula el valor de χ^2 por la siguiente ecuación:

$$\chi^2 = \frac{(ST - SC)^2}{SC} \quad (10)$$

Ecuación 10. Determinación de χ^2 para determinar la significancia del método

Si χ^2 es mayor a 5 indica que la letalidad es significativa.

Crecimiento

Cuando un número significativo de animales en la prueba no alcanza el estadio J4 o el estado adulto. Este parámetro se obtiene a partir de la siguiente:

$$C = 100 \times \left(\frac{J4T + AT/ST}{J4C + AC/SC} \right) \quad (11)$$

Ecuación 11. Determinación del crecimiento de los organismos

Donde:

C = crecimiento

$J4T$ = número de organismos J4 en la población de prueba

AT = número de organismos adultos en la población prueba

ST = número de sobrevivientes de la prueba

$J4C$ = número de organismos $J4$ en la población control

AC = número de organismos adultos en la población control

SC = número de sobrevivientes del control

La significancia estadística de las diferencias entre el crecimiento en el control y el observado en la muestra problema también se calcula a través del análisis por χ^2 , a partir de la siguiente ecuación:

$$C = 100 \times \left(\frac{(J4T + AT) - (J4C + AC)}{(J4C + AC)} \right)^2 \quad (12)$$

Ecuación 12. Determinación de χ^2 para determinar la significancia en el crecimiento de los organismos

Con estos datos es posible establecer si se presentó una inhibición o estimulación del crecimiento.

Maduración

La maduración resulta de un desarrollo normal hasta el estadio de $J4$; sin embargo, los nemátodos no logran la maduración gonádica que les permite convertirse en adultos y avanzar su reproducción. La evolución del estadio $J4$ a adulto requiere de la acción de esteroides y de la actividad genética. La inhibición específica de esta muda sugiere la acción de agentes genotóxicos. Para el cálculo de este parámetro se emplea la siguiente ecuación:

$$M = 100 \times \frac{(AT) / (J4T + AT)}{(4C + J4C + AC)} \quad (13)$$

Ecuación 13. Determinación de la Maduración de los organismos

Donde:

M = maduración

AT = número de organismos adultos en la población prueba

$J4T$ = número de organismos $J4$ en la población de prueba

AC = número de organismos adultos en la población control

$J4C$ = número de organismos $J4$ en la población control

La significancia estadística de las diferencias entre la maduración en el control y la muestra problema también se calcula a través del análisis por χ^2 , a partir de la siguiente ecuación:

$$\chi^2 = 100 \times \frac{(AT - AC)^2}{(AC)} \quad (14)$$

Ecuación 14. Determinación de la significancia en la maduración de los organismos

Si χ^2 es mayor a 5 indica un efecto significativo en la maduración.

Estado general de salud

Es un valor sumario que relaciona los diversos parámetros medidos y pone énfasis en la comparación del crecimiento y de la maduración. Para ello, se da a los diferentes parámetros un valor de peso ponderado, que para la sobrevivencia es de 4, para el crecimiento de 2 y para la maduración de 1. Para su cálculo se emplea la siguiente ecuación:

$$E = 100 \times \frac{(4 \times S) + (2 \times C) + M}{7} \quad (15)$$

Ecuación 15. Determinación del estado general de salud de los organismos

Donde

E = estado general de salud

S = sobrevivencia

C = crecimiento

M = maduración

Aceptabilidad de los resultados

Los resultados de la prueba deben ser ignorados y la prueba repetida si alguno de los siguientes puntos es observada:

- Si menos que el 90% de la población control alcanza el estado adulto
- Si más del 10% de la población control muere
- Si hay crecimiento microbiano excesivo en el sistema de prueba

2.3.1.7. Otros métodos para evaluar la toxicidad

La comisión Europea, propone también los siguientes métodos para la determinación de la toxicidad y otros efectos sobre la salud (Comisión Europea, 2016):

- Mutación génica en *Saccharomyces cerevisiae*
- Recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae*
- Mutación génica de células de mamífero *in vitro*
- Lesión y reparación de ADN: síntesis de ADN no programada en células de mamífero *in vitro*
- Ensayo *in vitro* de intercambio de cromátidas hermanas
- Ensayo de letalidad recesiva ligada al sexo en *Drosophila melanogaster*
- Ensayo de transformación de células de mamífero *in vitro*
- Ensayo de letalidad dominante en roedores
- Ensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonias de mamífero
- Ensayo de la mancha en ratón
- Translocación hereditaria en ratón
- Toxicidad oral subcrónica: ensayo de 90 días en roedores
- Toxicidad oral subcrónica: ensayo de 90 días en no roedores
- Toxicidad dérmica subcrónica: ensayo de 90 días en roedores
- Toxicidad subcrónica por inhalación: ensayo de 90 días en roedores
- Ensayo de toxicidad crónica
- Estudio de teratogenicidad: roedores y no roedores
- Ensayo de carcinogénesis
- Ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis
- Ensayo de toxicidad para la reproducción en una generación
- Ensayo de toxicidad para la reproducción en dos generaciones

2.4. Conclusión

La capacidad antioxidante definida como el potencial de neutralizar a las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS y NOS) tiene como resultado la protección al daño celular promovido por dichas especies reactivas. La búsqueda de metabolitos de las plantas con dicha capacidad ha ido en incremento en las últimas décadas dados los beneficios que aportan, se ha demostrado que las moléculas con capacidad antioxidante además guardan un vínculo estrecho con otras actividades biológicas de importancia, como lo son antitumorales, anticancerígenas, antimicro-

crobianas, antiinflamatorias, antidiabéticas, entre otras; por lo que su aislamiento y estudio son de gran importancia para la industria farmacéutica, cosmetológica y alimentaria. Dentro los principales protocolos para la determinación de dicha capacidad podemos mencionar la neutralización del radical DPPH⁺, ABTS^{•+}, AAPH⁺, ORAC, así como los análisis de reducción de diferentes especies químicas como el método CUPRAC (Cupric ion reducing antioxidant capacity) el método FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power). Si una molécula presenta una actividad biológica específica, es necesario determinar si dicha molécula tiene efectos de toxicidad dependiendo de su dosis, por lo tanto, es de vital importancia el estudio de la concentración efectiva y de la concentración de letalidad en organismos vivos, ya sea por técnicas *in vitro*, pero más aún en técnicas *in vivo* que indiquen el grado de impacto sobre sistemas pluricelulares para escalar después en la vía de implementación a nivel clínico sobre pacientes. Es aquí que las técnicas como el ensayo de letalidad sobre *A. salina*, *D. magna*, el ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla *Allium cepa* L, entre otros, nos ofrecen protocolos que cumplen con el principio de las 3 «R» Reducción, Refinamiento y Reemplazo en los sistemas de investigación, que nos brindan además de beneficios como bajo costo, menor número de organismos involucrados y una alta reproducibilidad.

Referencias

- Agudo, L. (2002). Técnicas para la determinación de compuestos antioxidante en alimentos. *Autodidacta*, 27-34.
- Alvarez, R., Carvalho, C.P., Sierra, J., Lara, O., Cardona, D., & Londoño-Londoño, J. (2012). Citrus juice extraction systems: effect on chemical composition and antioxidant activity of clementine juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(3), 774-81. <http://doi.org/10.1021/jf203353h>
- Aoki M, K., Encarnación-Dimayuga, R., & Cortés A, A. R. (2005). Evaluación toxicológica de productos naturales usando microtécnicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 36(1), 11-17.
- Arencibia-Arrebola, F.D., Fernández, R.L.A., López-Feria, Y., Fariñas-Medina, M., Infante-Bourzac, J.F., & Prieto-Díaz, J. L. (2003). Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda. *Retel revista de toxicología en línea*, 1-15.

- Báez-Díaz, C. M., Ronco, A., & Pica-Granados, Y. (2008). Ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla *Allium cepa* L mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces Reactivos y soluciones. En *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México* (1a ed., pp. 33-40). México DF: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología.
- Barahona, M.V., & Sánchez-Fortún, S. (1999). Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. *Environmental Pollution*, 104(3), 469-476. [http://doi.org/10.1016/S0269-7491\(98\)00152-3](http://doi.org/10.1016/S0269-7491(98)00152-3)
- Benzie, I.F., & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-6. <http://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bonofiglio, D., Giordano, C., De Amicis, F., Lanzino, M., & Ando, S. (2016). Natural Products as Promising Antitumoral Agents in Breast Cancer: Mechanisms of Action and Molecular Targets. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(8), 596-604.
- Carballo, J.L., Hernandez-Inda, Z.L., Perez, P., & Garcia-Gravalos, M.D. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2, 17. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-2-17>
- Caselli, A., Cirri, P., Santi, A., & Paoli, P. (2016). Morin: A Promising Natural Drug. *Current Medicinal Chemistry*, 23(8), 774-791. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867323666160106150821>
- Cellbiolabs. (2016). ORAC. Recuperado 11 de mayo de 2016, a partir de <http://www.cellbiolabs.com/orac-oxygen-radical-antioxidant-capacity-assay>
- Comisión Europea. (2016). Parte B: Métodos para la determinación de la toxicidad y otros efectos sobre la salud. Recuperado 13 de abril de 2016, a partir de http://ec.europa.eu/environment/archives/dansub/pdfs/annex5b_es.pdf
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G.E., Navarrete, A., & Mata, R. (2007). Acute toxicity and

- mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol*, 110(2), 334-342. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.001>
- Díaz-Báez, M.C., Granados, Y.P., & Ronco, A. (2008). Ensayos para agua dulce. En *Ensayos Toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México* (1a ed., pp. 17-32). México DF.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología.
- Formagio, A.S.N., Ramos, D.D., Vieira, M.C., Ramalho, S.R., Silva, M.M., Zarate, N.A.H., et al. (2015). Phenolic compounds of Hibiscus sabdariffa and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, 75(1), 69-76. <http://doi.org/10.1590/1519-6984.07413>
- García-Hernández, D. G. (2016). *Actividad biológica, separación, aislamiento e identificación de metabolitos activos de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Granados, Y.P. (2008). Ensayo de toxicidad con el nemátodo Panagrellus redivivus. En *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México* (1a ed., pp. 139-154). México DF.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología.
- Granados, Y.P., Ronco, A., & Baez-Díaz, M.C. (2008). Ensayo de toxicidad agua con el cnidario Hydra attenuata. En *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México* (1a ed., pp. 41-54). México DF.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología.
- Gutiérrez-Avella, D.M., García-Ortiz, C.A., & Mendoza-Cisneros, A. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. En *Simposio de Metrología* (pp. 1-5).
- Harwig, J., & Scott, P.M. (1971). Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Applied microbiology*, 21(6), 1011-6.
- Jahanban-Esfahlan, A., Modaeinama, S., Abasi, M., Abbasi, M.M., & Jahanban-Esfahlan, R. (2015). Anti Proliferative Properties of Melissa officinalis in

- Different Human Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(14), 5703-5707. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.14.5703>
- Jaki, B., Orjala, J., Bürgi, H.-R., & Sticher, O. (2008). Biological Screening of Cyanobacteria for Antimicrobial and Molluscicidal Activity, Brine Shrimp Lethality, and Cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology*, 41(4), 243-247. <http://doi.org/10.1076/phbi.37.2.138.6092>
- Martinez, M., Ramo, J.D., Torreblanca, A., & Díaz-Mayans, J. (1999). Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia parthenogenetica*. *Aquaculture*, 315-325. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00431-1](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00431-1)
- McLaughlin, J. (1991). Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. En Academic Press (Ed.), *K. Hostettmann, Assays for Bioactivity*. (pp. 2-32). San Diego, CA. USA.
- Mhadhebi, L., Mhadhebi, A., Robert, J., & Bouraoui, A. (2014). Antioxidant, Anti-inflammatory and Antiproliferative Effects of Aqueous Extracts of Three Mediterranean Brown Seaweeds of the Genus *Cystoseira*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 13(1), 207-220.
- Pastene, E.R. (2009). Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6), 449-455.
- Pelka, M., Danzl, C., Distler, W., & Petschelt, A. (2000). A new screening test for toxicity testing of dental materials. *Journal of dentistry*, 28(5), 341-345. [http://doi.org/10.1016/S0300-5712\(00\)00007-5](http://doi.org/10.1016/S0300-5712(00)00007-5)
- Plazas-Gonzalez, E.A. (2015). Tamizaje fitoquímico preliminar , evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* y toxicidad de seis especies de Ericaceas colombianas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(2), 182-199.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

- Salim, E.I., Abd El-Magid, A.D., Farara, K.M., & Maria, D.S.M. (2015). Antitumoral and Antioxidant Potential of Egyptian Propolis Against the PC3 Prostate Cancer Cell Line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(17), 7641-7651. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.17.7641>
- Sobrero, M.C., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). En *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México* (1a ed., pp. 55-68). México DF.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología.
- Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P., & Phillipson, J.D. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta medica*. <http://doi.org/10.1055/s-2006-959661>