



BIBLIOTECA DR. ROBERTO JABÓN Y JABÓN
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA**

27 de mayo 2021

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FITOQUÍMICOS, TOXICOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS DE TRES PLANTAS USADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL PANAMEÑA POR SUS EFECTOS A NIVEL DEL SISTEMA REPRODUCTIVO FEMENINO.

TRABAJO DE GRADUACIÓN

Presentado por:

**MEYBIS IVETT PITTI RODRÍGUEZ
CED: 4-790-2206**

**Como requisito parcial para optar por el título de
LICENCIADA EN FARMACIA.**

ASESORA:

DRA. LISBETH GÓMEZ MARTÍNEZ

CO-ASESORES:

**MSC. NICOMEDES JARAMILLO
MSC. VIELKA CABALLERO DE GUEVARA**

DAVID, CHIRIQUÍ, PANAMÁ

2020

RJST 4280

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, quienes siempre han estado apoyándome en las buenas y en las malas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios quién me ha dado la inteligencia, sabiduría y vida para culminar este trabajo.

A mi familia que día tras día me apoya y anima a seguir adelante.

A la Dra. Lisbeth Gómez por dirigirme, asesorarme y brindar de sus conocimientos para enriquecer la experiencia vivida en la elaboración de este trabajo.

Al MSc. Nicomedes Jaramillo por gestionar oportunamente materiales e instrumentación en el laboratorio y por su valioso asesoramiento.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
ÍNDICE DE FIGURA	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE GRÁFICAS	XII
ABREVIATURAS	XIII
CAPITULO I. ANTECEDENTES	
1.1. Resumen.....	3
1.2. Justificación.....	5
1.3. Objetivo General.....	5
1.3.1. Objetivos Específicos.....	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	
2.0. Introducción.....	7
2.1 Canchalagua (<i>Centaurium erythraea</i>).....	9
2.1.1 Usos medicinales.....	10
2.1.2 Sustancias activas.....	10
2.2 Pasma café (<i>Siparuna panamensis</i> o <i>guianensis</i>).....	11
2.2.1 Etnobotánica.....	12
2.2.2 Sustancias activas.....	12
2.3 Árbol María (<i>Calophyllum brasiliense</i>).....	13
	IV

2.3.1	Etnobotánica.....	14
2.3.2	Sustancias activas.....	15
2.4	Tamizaje fitoquímico.....	16
2.5	Pruebas de Toxicidad en Plantas.....	18
2.5.1	Bioensayo de <i>Artemia salina</i>	18
2.5.2	Fundamento del ensayo de <i>Artemia Salina</i>	19
2.5.3	Morfología de la <i>Artemia salina</i>	20
2.5.4	Reproducción de <i>Artemia salina</i>	21
2.5.5	Alimentación de la <i>Artemia Salina</i>	22
2.6	Fisiología Reproductiva de la rata.....	23
2.7	Ciclo reproductivo de la mujer.....	26
2.7.1	Hormonas que actúan en el Ciclo Reproductivo.....	27
2.8.	Disrupción Endocrina.....	29
2.8.1	Actividad anti-estrogénica.....	31

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1	Procedimiento de preparación de extractos hidroalcohólicos.....	33
3.1.1	Recolección y secado.....	33
3.1.2	Análisis físico-químico.....	33
3.1.2.1	Determinación de cenizas totales.....	33
3.1.2.2	Determinación de humedad.....	34
3.1.3.	Extracción de metabolitos secundarios.....	34
3.1.4	Concentración de los Extractos.....	35

3.2	Tamizaje fitoquímico.....	35
3.2.1	Identificación de presencia de alcaloides.....	36
3.2.2	Identificación de presencia de esteroides, terpenos y triterpenos.....	36
3.2.3	Identificación de presencia de flavonoides.....	36
3.2.4	Identificación de presencia de taninos.....	36
3.2.5	Identificación de presencia de glucósidos.....	37
3.2.6	Identificación de presencia de saponinas.....	37
3.2.7	Identificación de presencia de cumarinas.....	38
3.3	Procedimiento para bioensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i>	38
3.3.1	Procedimiento general.....	38
3.3.2	Eclosión de los huevos de <i>Artemia salina</i>	38
3.3.3	Preparación del medio de eclosión.....	39
3.3.4	Alimentación de <i>Artemia salina</i>	40
3.3.5	Metodología general para el ensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i>	40
3.4	Determinación de la toxicidad Aguda en el modelo de Artemia Salina	41
3.4.1	Determinación de la Toxicidad Aguda del extracto de <i>Centaurium erythraea</i>	43
3.4.2	Determinación de la toxicidad aguda del extracto de <i>Calophyllum brasiliense</i>	44
3.4.3	Determinación de la toxicidad aguda del extracto de <i>Sirapuna guianensis</i>	45

3.5	Efecto de la Administración Intraperitoneal del extracto <i>Calophyllum brasiliense</i> sobre la citología vaginal de ratas.....	46
3.5.1	Procedimiento general.....	46
3.5.2	Diseño experimental.....	47

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Análisis físico-químico de la planta.....	49
4.1.1	Cenizas totales.....	49
4.1.2	Porcentaje de humedad.....	50
4.2	Concentración final de los extractos.....	51
4.3	Marcha Fitoquímica.....	52
4.4	Determinación de la toxicidad aguda de extractos de plantas sobre el bioensayo de <i>Artemia salina</i> nauplios.....	56
4.4.1	Toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de la <i>C. erythraea</i> en nauplios con el método de <i>Artemia salina</i>	56
4.4.2	Toxicidad Aguda del extracto de <i>C. brasiliense</i> en nauplios de <i>Artemia salina</i>	58
4.4.3	Toxicidad aguda en <i>Siparuna guianensis</i>	60
4.5	Determinación de patrón de toxicidad aguda del extracto <i>C. brasiliense</i> en Ratas Wistar.....	62
4.5.1	Efectos macroscópicos del extracto <i>C. brasiliense</i> en el aspecto corporal.....	64
4.5.2	Efecto de la administración intraperitoneal del extracto <i>C. brasiliense</i> en el peso corporal.....	66

4.5.3	Efecto de la administración intraperitoneal del extracto <i>C. brasiliense</i> en la citología vaginal de ratas adultas no ovariectomizadas.....	67
4.6	Efecto de la administración del extracto de <i>C. brasiliense</i> en el ciclo estral de ratas adultas.....	69
4.6.1	Administración del vehículo (solución salina) durante la fase diestro de en ratas hembras adultas	69
4.6.2	Administración de 25 mg/kg del extracto de durante la fase de diestro a ratas adultas Individuos administrados en fase diestro con 25 mg/kg del extracto.....	70
4.6.3	Administración de 50 mg/kg del extracto de durante la etapa de metaestro a ratas adultas	71
4.6.4	Individuos administrados en fase diestro con 70 mg/kg del extracto.....	72
4.6.5	Individuos administrados en fase diestro con 85 mg/kg del extracto.....	73

CAPÍTULO V

Conclusiones y Recomendaciones.....	76
Anexos.....	80

BIBLIOGRAFÍA.....	83
--------------------------	-----------

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Partes de la planta <i>C. erythraea</i>	9
Figura 2. Follaje del <i>S. guianensis</i>	11
Figura 3. Partes de la planta <i>C. brasiliense</i>	14
Figura 4. Ejemplares de Artemia adultos.....	20
Figura 5. Ciclo vital en sus estados reproductivos.....	22
Figura 6. Células que aparecen en mayor proporción en el exudado vaginal de las ratas en las diferentes etapas.....	24
Figura 7. Ciclo estral de 4 días en la rata a nivel hormonal y la citología vaginal..	25
Figura 8. Fase del ciclo menstrual en la mujer y hormonas que actúan.....	29
Figura 9. Mecanismo de disrupción endocrina.....	30
Figura 10. Eclosión de los quistes.....	39
Figura 11. Medio de donde eclosionaron los quistes de Artemia.....	40
Figura 12. Espécimen de nauplios.....	41
Figura 13. Sistema de aireación para el ensayo de toxicidad aguda con nauplios de <i>Artemia salina</i>	42
Figura 14. Concentraciones finales del extracto <i>C. erythraea</i>	43
Figura 15. Concentraciones finales del extracto <i>C. brasiliense</i>	44
Figura 16. Concentraciones finales del extracto <i>S. guianensis</i>	45
Figura 17. Comparación entre ratas en tratamiento y control.....	65
Figura 18. Ciclo estral de ratas adultas.....	69

Figura 19. Efecto de la administración intraperitoneal de 25mg/kg del extracto <i>C. brasiliense</i> en fase diestro (B1).....	70
Figura 20. Efecto de la administración intraperitoneal de 50 mg/kg del extracto <i>C. brasiliense</i> en fase metaastro.....	71
Figura 21. Efecto de la administración intraperitoneal de 70 mg/kg del extracto <i>C. brasiliense</i> en fase diestro (B2).....	72
Figura 22. Efecto de la administración intraperitoneal de 85 mg/kg del extracto <i>C. brasiliense</i> en fase diestro (B3).....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>C. erythraea</i>	9
Tabla 2. Clasificación taxonómica <i>S. guianensis</i>	11
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>C. brasiliense</i>	13
Tabla 4. Cenizas totales.....	49
Tabla 5. Porcentaje de humedad.....	50
Tabla 6. Concentración de extractos.....	51
Tabla 7. Porcentaje de Rendimiento de los extractos.....	51
Tabla 8. Resultados obtenidos en las pruebas de tamizaje fitoquímico.....	52
Tabla 9. Medición de parámetros en el medio de cultivo de <i>Artemia salina</i>	56
Tabla 10. Porcentaje de letalidad (unidades probit) de <i>Artemia salina</i> después de 24 horas de exposición al extracto de <i>C. erythraea</i>	56
Tabla 11. Porcentaje de letalidad (unidades probit) de <i>Artemia salina</i> después de 24 horas de exposición al extracto <i>C. brasiliense</i>	58
Tabla 12. Porcentaje de letalidad (unidades probit) de <i>Artemia salina</i> después de 24 horas de exposición al extracto <i>S. guianensis</i>	60
Tabla 13. Determinación de toxicidad aguda (probit) del extracto de <i>C. brasiliense</i> en ratas wistar adultas.....	62
Tabla 14. Síntomas observados en las ratas tratadas con el extracto <i>C. brasiliense</i>	64

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Toxicidad aguda de <i>Artemia salina</i> nauplios en exposición al extracto <i>C. erythraea</i> después de 24 horas.....	57
Gráfica 2. Toxicidad aguda de <i>Artemia salina</i> nauplios en exposición al extracto <i>C. brasiliense</i> después de 24 horas.....	59
Gráfica 3. Toxicidad aguda de <i>Artemia salina</i> nauplios en exposición al extracto de <i>S. guianensis</i> después de 24 horas.....	61
Gráfica 4. Toxicidad aguda en ratas wistar adultas tratadas con extracto de <i>C. brasiliense</i>	63
Gráfica 5. Efecto del extracto hidroalcohólico <i>C. brasiliense</i> sobre el peso corporal.....	66
Gráfica 6. Efecto de la administración intraperitoneal del extracto de <i>C. brasiliense</i> sobre la citología vaginal de ratas wistar adultas después de 21 días de tratamiento.....	67

ABREVIATURAS

CL50: Concentración Letal media.

C. e.: *Centaurium erythraea*

DL50: Dosis Letal media.

E.C.b.: Extracto de *Calophyllum brasiliense*

ERE: Elemento de respuesta estrogénica.

ER α : Receptor estrogénico alfa.

ER β : Receptor estrogénico beta

FSH: Hormona Folículo estimulante.

LDB: Dominio de unión del Ligando (ligand binding domain).

LH: Hormona Luteinizante.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

RFSH: Receptor de la hormona folículo estimulante.

RLH: Receptor de la hormona Luteinizante.

S. g.: *Siparuna guianensis*

CAPITULO I

ANTECEDENTES

ÁREA DE TRABAJO

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecotoxicología, Facultad de Ciencias
Naturales y Exactas,**

Universidad Autónoma de Chiriquí,

bajo la dirección de la

Doctora Lisbeth Gómez Martínez, con el respaldo parcial del Proyecto

SENACYT: 101-4-REP 09-003

1.1 RESUMEN

Se evaluaron parámetros fitoquímicos y toxicológicos, de las plantas *Centaurium erythraea* (Canchalagua), *Calophyllum brasiliense* (Palo María) y *Siparuna panamensis* (Pasma Café), usadas tradicionalmente en Panamá, como reguladores del ciclo menstrual, abortifacientes y en otras afecciones de salud. El tamizaje fitoquímico estandarizado del extracto hidroalcohólico de *C. erythraea* mostró significativa presencia de flavonoides, taninos y glucósidos. Las hojas de *Siparuna guianensis* mostraron mayor presencia de saponinas, alcaloides y glucósidos y el extracto hidroalcohólico de corteza del *C. brasiliense* mostró alta proporción de alcaloides, esteroides, triterpenos, taninos, saponinas y cumarinas. La toxicidad aguda de estas plantas fue evaluada mediante el ensayo de *Artemia salina* (Meyer, 1982). La Concentración Letal 50 (CL50), obtenida por Análisis *Probit* después de 24 horas de exposición de los nauplius a diferentes concentraciones de los extractos hidroalcohólico fue, para *C. erythraea* de 114,670 $\mu\text{g/ml}$; para *Calophyllum brasiliense*, 599.06 $\mu\text{g/ml}$, y para *Siparuna guianensis*, de 1,176.87 $\mu\text{g/ml}$. Estos valores indican que la *C. erythraea* no presenta toxicidad considerable al igual que la *Siparuna guianensis*, sin embargo, el *C. brasiliense*, si mostró un moderado potencial de toxicidad. Estos resultados fueron confirmados en ratas hembras Wistar, en las que el *C. brasiliense* a dosis intraperitoneal de 50 mg/kg produjo pelo erizado, hemorragias nasales y oculares, y debilidad general y a dosis de 100 mg/kg el 90% de los animales murieron. Estos resultados podrían estar relacionados con la alta presencia de taninos, saponinas y cumarinas observadas en esta planta.

Palabras Clave: *Centaurium erythraea*; *Calophyllum brasiliense*; *Siparuna guianensis* Tamizaje fitoquímico, *Artemia salina*.

ABSTRACT

Phytochemical and toxicological parameters of the plants *Centaurium erythraea* (Canchalagua), *Calophyllum brasiliense* (Palo Maria) and *Siparuna panamensis* (Pasma Café), traditionally used in Panama, as regulators of the menstrual cycle, abortifacient and in other health conditions were evaluated. Standardized phytochemical of the hydroalcoholic extract of *C. erythraea* showed a significant presence of flavonoids, tannins and glycosides. The leaves of *Siparuna guianensis* showed a higher presence of saponins, alkaloids and glycosides and the hydroalcoholic extract of *C. brasiliense* bark showed a high proportion of alkaloids, sterols, triterpenes, tannins, saponins and coumarins. The acute toxicity of these plants was evaluated by means of the *Artemia salina* test (Meyer, 1982). The Lethal Concentration 50 (LC50), obtained by Probit Analysis after 24 hours of exposure of the nauplius to different concentrations of the hydroalcoholic extracts was, for *C. erythraea* of 114.670 μg / ml, for *Calophyllum brasiliense*, 599.06 μg / ml, and for *Siparuna guianensis*, 1,176.87 μg / ml. These values indicate that *C. erythraea* does not present considerable toxicity like *Siparuna guianensis*, however, *C. brasiliense*, did show a moderate potential for toxicity. These results were confirmed in female Wistar rats, in which *C. brasiliense* at an intraperitoneal dose of 50 mg / kg, it produced bristly hair, nose and eye bleeding, and general weakness, and at a dose of 100 mg / kg, 90% of the animals died. These results could be related to the high presence of tannins, saponins and coumarins observed in this plant.

Keywords: *Centaurium erythraea* *Calophyllum brasiliense* *Siparuns guianentis*
Phytochemical screening, *Artemia salina*

1.2 JUSTIFICACIÓN

La presente investigación se enfocará en estudiar la toxicidad aguda a través del método *Artemia salina* en plantas nativas de Panamá utilizadas a nivel del sistema reproductor. El conocimiento adquirido permitirá determinar si el uso de estas plantas es seguro, y las concentraciones a la cual pueden perjudicar la salud de una persona. Esto puede contribuir a disminuir el uso desmesurado de estas plantas y concientizar a la población que las utiliza a emplearlas correctamente y así reducir los efectos y daños que se pueden producir por utilizarlas incorrectamente.

1.3 OBJETIVOS GENERALES

1. Evaluar los parámetros fitoquímicos y toxicológicos de las plantas canchalagua (*Centaurium erythraea*), árbol María (*Calophyllum brasiliensis*) y pasmo café (*Siparuna guianensis*) distribuidas en Panamá y utilizadas en desordenes reproductivos de la mujer.

1.3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar mediante tamizaje fitoquímico los principales metabolitos secundarios presentes en las plantas mencionadas.
2. Determinar la toxicidad relativa aguda en las plantas mencionadas mediante el método de *Artemia salina*.
3. Evaluar mediante la citología vaginal la actividad farmacológica de la planta *Calophyllum brasiliense*.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

Históricamente el ser humano ha utilizado de manera empírica múltiples plantas para aliviar sus problemas de salud. Sin embargo, la mayoría de estas plantas no han sido evaluadas adecuadamente para conocer su seguridad. Estudios recientes indican que existen por lo menos 298000 plantas panameñas de las cuales, varias de ellas no se han registrado oficialmente, ni tienen investigaciones de sus propiedades químicas y medicinales (Martins, 2011).

La medicina tradicional es ampliamente aceptada en las diferentes culturas y cada día aumenta su utilización debido a la fácil obtención de plantas medicinales y productos herbarios además que su costo son más accesibles a las poblaciones. La directora general de la OMS, Dra. Margaret Chan, declaró en la conferencia sobre medicina tradicional para los países Suroriental que "las medicinas tradicionales de calidad, seguridad y eficacia comprobada contribuyen a asegurar el acceso de todas las personas a la atención de salud (OMS, 2013).

Las enfermedades que mayormente son tratadas con plantas medicinales son las relacionadas con el sistema gastrointestinal y el reproductivo. Según datos de la OMS, en Latinoamérica muchas mujeres utilizan las plantas medicinales para cuidar su salud sexual y reproductiva. Mayormente la medicina tradicional trata trastornos menstruales como amenorrea que es la ausencia de la menstruación por periodos prolongados o también la llegada tardía de la menstruación a las jóvenes (Hall, 2016). Algunas plantas son utilizadas para trastornos menstruales debido a que poseen propiedades emenagogas, mientras que otras plantas son utilizadas por sus propiedades anticonceptivas y abortivas para interrumpir el embarazo.

Las diferentes propiedades que poseen las plantas medicinales para actuar en el sistema reproductor se deben al contenido de componentes fitoquímicos similares a sustancias químicas endógenas del cuerpo animal y humano. Estas sustancias

fitoquímicas, conocidas como "fitoestrógenos" están correlacionadas con las hormonas sexuales del sistema reproductor.

Los fitoestrógenos se agrupan en cinco familias (flavonoides, isoflavonoides, cumestanos, lignanos y estilbenos). Estas sustancias poseen actividad biológica variable y dependiente de múltiples factores. Pueden además presentar propiedades carcinogénicas o anticancerígenas; o tener actividad en el sistemas renal, cardiovascular y nervioso (White, 2002). El consumo de plantas que contengan fitoestrógenos puede ser beneficioso o perjudicial. Es así como se descubrieron los fitoestrógenos en la década de los 40, cuando se observó que las ovejas que consumían trébol rojo mostraban problemas reproductivos (White, 2002).

La medicina tradicional en Panamá utiliza gran variedad de plantas para tratar los trastornos del sistema reproductor, pero algunas de estas plantas no se les ha realizado un análisis fitoquímico ni estudios de seguridad. Estos estudios aportarían conocimientos importantes para la medicina sobre plantas nativas del país.

Descripción Botánica

Las plantas en investigación se encuentran en la vegetación de nuestro país. Dos de estas plantas se utilizan empíricamente como reguladores menstruales (Canchalagua y Pasma café), mientras que el Árbol María que se utiliza como abortivo; esta información fue extraída de las encuestas realizadas (ver anexos). Las plantas en estudios fueron identificadas por el Herbario de la Universidad Autónoma de Chiriquí.

2.1. Canchalagua (*Centaurium erythraea*)

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *C. erythraea*

Reino	Plantea
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Gentianales
Familia	Gentianaceae
Género	Centaurium

(asturnatura.com, 2007)



Figura 1. Canchalagua (*C. erythraea*). A: Raíz y Tallo. B: Partes aéreas (hojas y Flores)

Fotografía: Meybis Pitti, 2020

Esta planta crece a plena luz, aunque soporta sombra. Los suelos donde se encuentra son moderadamente secos o húmedos y débilmente ácidos (pH 4.5 a 7.5). En los suelos fértiles no está presente. Crece generalmente en suelos moderadamente pobres o ligeramente ricos en nitrógeno (Asturnatura.com, 2007). Esta planta se encuentra en bosques y matorrales, también se puede encontrar en cañales. Es una planta europea, pero se encuentra naturalizada en algunas zonas de América. Es una planta bianual o anual puede tener una altura entre 10 y 50 cm, sus hojas en roseta basal son obovadas y elípticas. Las hojas superiores a lo largo del tallo erecto no presentan peciolo (Vogel, 2018). Ver figura 1

2.1.1. Usos medicinales

Centaurium erythraea es utilizado como antiparasitario, para problemas digestivos, como terapia hepatobiliar, como febrífugo, hepato-protector y emético (Vidari & Vitafinzi, 2010). Sus hojas y tallo presentan un desagradable sabor amargo, y es por esto que muchas personas tradicionalmente lo utilizan como colagogo y emenagogo. Es por esta propiedad amarga que en otros países tiene el nombre común de "hiel de la tierra". Además, se usa como aperitivo (Asturnatura.com, 2007). El sabor amargo de esta planta se debe principalmente a los glucósidos secoiridoides y a los alcaloides presentes como la gentianina (Vidari & Vitafinzi, 2010).

Esta planta es utilizada en Panamá para enfermedades del sistema urinario y como regulador menstrual mostrando alguna efectividad (Comunicación personal).

2.1.2. Sustancias activas

En general esta planta contiene xantonas glicosiladas, glucósidos iridoides y secoiridoides, flavonoides, ácido oleanólico, ácido nicotínico, gentianina y pequeñas cantidades de otros alcaloides (Natural Herbs, 2015).

2.2. Pasma café (*Siparuna panamensis* o *guianensis*)

Tabla 2. Clasificación taxonómica *S. guianensis*

Reino	Plantea
Clase	Magnoliopsida
Orden	Laurales
Familia	Siparunaceae
Genero	Siparuna
Especie	Guianensis

(Muséum national d'Histoire naturelle, 2003)



Figura 2. Pasma café (*S. guianensis*), follaje.

Fotografía: Meybis Pitti, 2020

Es un árbol de 5 a 10 metros de alto, tronco usualmente con varios brotes a partir de la base. Hojas simples y opuestas de 5 a 25 cm de largo y de 3 a 5 cm de ancho, oblongas y elípticas, con ápices agudos y acuminados, bordes enteros y base obtusa o redondeada. Las hojas al romperlas despiden un olor muy fuerte y penetrante. Sus flores son verdes o amarillas y sus frutos son verdes, carnosos de 1 a 1.5 cm de diámetro, tornándose rojo purpura al madurar. Esta especie crece a

baja y medianas elevaciones en bosques húmedos o muy húmedos (Renner, et al, 2005).

En la República de Panamá esta planta se encuentra en las provincias de Bocas del Toro, Chiriquí, Veraguas, Darién, Herrera, Panamá y también en el área del Canal, a una altura por debajo de los 1000 metros sobre el mar (Torres et al, 2016).

2.2.1. Etnobotánica del Pasmo Café.

La *Siparuna guianensis* es utilizada como antiespasmódico, como paliativo para diferentes dolores en el cuerpo, y en combinación con otras plantas es utilizado para la artritis en la zona de la Reserva Forestal de Montuoso en el distrito de las Minas en Panamá (Torres et al, 2016).

La familia de la *Siparuna* presenta actividad antibacteriana. Esta actividad fue confirmada en la especie *Siparuna guianensis* (Pino. et al, 2008).

La *Siparuna guianensis* presenta efecto antiplasmodium debido a constituyentes como flavonoides y terpenos. También muestra actividad a nivel del Sistema nervioso central, debido a los alcaloides que contiene por lo que se ha utilizado en la ansiedad e insomnio (Rodríguez et al, 2007).

En Colombia se usa por sus propiedades antifebrífugas, analgésicas, anti-inflamatorias, antitusiva, hipotensoras y cicatrizantes (Mahecha, 2010).

Las hojas y brotes nuevos se utilizan en baños y se colocan sobre la frente de las personas para aliviar los espasmos y dolores de cabeza. En Panamá se usa como un regulador menstrual, en forma de decocción de sus hojas (Comunicación personal).

2.2.2. Sustancias activas

Las sustancias activas que se han encontrado de esta planta son alcaloides como la liriodenina y cassamedina descubiertos por Braz-filho et al. (1976). Además, contiene terpenos como δ -elemeno, germacreno y β -elemeno descubiertos por Antonio et al. (1976).

2.3. Árbol María (*Calophyllum brasiliense*)

El *Calophyllum brasiliense* es conocido en Panamá como Palo María o Santa María. Otros nombres comunes en Centroamérica son: árbol de aceite (Colombia), palo santa María (México), ocuje (Cuba), barí (República Dominicana), cedro María (Centroamérica), jacareuba, guarandí (Brasil), balsamaria (Bolivia), lagarto capsi (Perú), entre otros.

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *C. brasiliense*.

Reino	Plantea
Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Orden	Malpighiales
Familia	Calophyllaceae
Genero	Calophyllum
Especie	Brasilienses

(Missouri Botanical Garden, 2018)



Figura 3. Arbol María (*C. brasiliense*) A: tallo. B: follaje.

Fotografía: Meybis Pitti, 2020

Esta planta se describió por primera vez en Brasil. Es por eso el nombre de la especie “brasilienses”. El significado etimológico de *Calophyllum* es hoja hermosa (Souza, 2006).

Es un árbol de 20 a 30 metros de altura, y el diámetro del tronco es de 40 a 60 cm. Su tronco es recto con ramas ascendentes de copa redondeada, extendida y densa. La corteza es fisurada con un grosor entre 10 a 20 cm. Las hojas son coriáceas, decusadas, elípticas u oblongas, el haz verde oscuro y brillante y envés verde pálido (García et al, 2014).

Se distribuye desde el sur de México, toda Centroamérica hasta el norte de Sudamérica. Normalmente se encuentra en faldas de colinas costeras y cerca de fuentes de agua como ríos.

2.3.1. Etnobotánica

De esta planta se utilizan todas sus partes. En Colombia se extrae un aceite verdoso de la corteza de *Calophyllum brasiliense*, y otras especies de *Calophyllum*, para aplicarlo en llagas y heridas. En Brasil es utilizado en el tratamiento de úlceras e inflamación. En Perú emplean la planta para tratar afecciones virales y tumores.

En otros países como México la infusión de corteza es utilizada para limpiar la matriz de la embarazada al tomarlo por nueve días, y emplear el aceite de la semilla para tratar enfermedades cutáneas (García et al, 2014). En Panamá se utiliza como un abortivo (Comunicación personal).

2.3.2. Sustancias activas

Algunos de los compuestos que se han aislados de este árbol son: compuestos fenólicos simples (ácido gálico), triterpenos y esteroides (friedelina, canofilol y β -sitosterol), flavonoides (quercetina, hepirósido y epicatequina), xantonas, cromanonas y cumarinas. Las cumarinas aisladas de esta planta son de dos tipos grupos: cumarinas tipo mammea y las dipiranocumarinas tetracíclicas (García et al, 2014).

2.4. TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

La fitoquímica estudia las propiedades y estructuras químicas de los productos naturales presentes en las plantas, a través de lo que se conoce como marcha fitoquímica o tamizaje fitoquímico. Este estudio lo constituyen una serie de pasos, donde se observan reacciones como cambio de color, fluorescencia, entre otros. Gracias a este análisis se puede determinar la existencia de compuestos químicos particulares y metabolitos secundarios (Castillo et al, 2017).

El tamizaje fitoquímico consiste en el reconocimiento de los principios activos de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de color y de precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico (Palacios, 2008).

Este análisis ayuda a direccionar al conocimiento de la posible actividad farmacológica que puede tener la planta en estudio. Estas reacciones son selectivas para clases o grupos de compuestos. Son simples y rápidas, detectan la mínima cantidad posible y se utiliza un mínimo de equipo de laboratorio.

El tipo o grupo de compuestos que contenga la planta puede determinar la actividad biológica y terapéutica, esta actividad es dependiente de la cantidad presente en la planta, es así que cuando un grupo de compuestos tiene alta presencia en la planta un efecto específico en el organismo puede estar implícito o potencialmente latente.

Los triterpenos tienen variadas propiedades curativas como sedantes, antiespasmódico, desinfectantes. Algunos triterpenos tienen propiedades diuréticas y efecto antihistamínico como es en el caso de los triterpenos de la manzanilla. La unión de los triterpenos al estrógeno puede inhibir procesos inflamatorios al suprimir ciertas enzimas relacionadas a este proceso (Bruneton, 1999).

Los esteroides es otro grupo que tiene gran variedad de propiedades. Los llamados fitoesteroides (β -Sitosterol, Ampesterol y Estigmasterol) se pueden encontrar en las

plantas superiores. Estos presentan propiedades antiinflamatorias, antitumorales, fungicidas y bactericidas, pero la propiedad curativa más resaltante de estos compuestos es su efecto hipo-colesterolémico (Valenzuela et al, 2004).

Los taninos son ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Estos tienen propiedades antioxidantes, pueden inhibir diferentes enzimas y también algunos virus, pero la propiedad o efecto que más los distingue es la astringencia por la afinidad que poseen para unirse a macromoléculas (Bruneton, 1999).

Los alcaloides son uno de los metabolitos secundarios de plantas más estudiados, debido a su amplia variedad de actividades que han sido reconocidas desde la antigüedad. Estos compuestos actúan en el sistema nervioso, también algunos se usan como anestésicos locales, antipalúdicos, antitumorales, entre otros efectos. Una de la mayor característica de los alcaloides es que son muestran alta potencia para la mayoría de sus efectos (Bruneton, 1999).

Los flavonoides son uno de los que más distribuido está en el reino vegetal y aunque se le atribuyen muchas propiedades, estas propiedades no están relacionadas con su estructura salvo algunos casos. Se les atribuye el ser venoactivos, inhibidores enzimáticos, antiinflamatorios entre otros. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran los isoflavonas que poseen actividad estrogénica.

Las isoflavonas más conocidas son las daidzeína y genisteína que se encuentran en la semilla de soja y sus productos derivados. Las isoflavonas y sus metabolitos intestinales actúan uniéndose a los receptores estrogénicos y produciendo este efecto estrogénico de manera débil. Además, son inhibidores de la enzima tirosinquinasa responsable de la transformación y proliferación celular, gracias a esto se ha demostrado su utilidad en la carcinogénesis mamaria y prostática. Otros beneficios o propiedades que se le atribuyen es en la menopausia y osteoporosis disminuyendo los síntomas y riesgos de desarrollo respectivamente (Bruneton, 1999).

Los glucósidos cardiotónicos son un grupo bien estudiado que ha demostrado tener actividad a nivel del corazón en diferentes áreas tales como frecuencia,

conductibilidad, fuerza y velocidad de contracción (inotrópicos positivos) además algunos presentan efecto diurético por lo que son utilizados en casos de nefritis. Cabe resaltar que entre menos carbohidratos ligados tenga aumenta su toxicidad y disminuye el efecto cardiotónico (Bruneton, 1999; Santizo, 2004).

Las saponinas son glicósidos esteroides que tienen como mayor propiedad es ser hemolíticos esto se debe al aumento de la permeabilidad de la membrana eritrocitaria cuando los esteroides de la saponina se unen a esta, dando paso a la salida de la hemoglobina. Algo que caracteriza a las saponinas y la producción abundante de espuma. Tienen otras propiedades como el ser espermicidas, antitumorales, analgésicas y actividad inmunomoduladora, también cabe destacar que son citotóxicos (Bruneton, 1999).

Las cumarinas poseen un anillo aromático unido a un anillo pirano. Estos se clasifican en cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas y otras. Estos metabolitos poseen actividad antimicrobiana, bacteriostática y antitumoral (Jain & Joshi, 2012), además algunos estudios le atribuyen acción vasodilatadora e inhibición de la agregación plaquetaria (Correia, 2014).

2.5. Pruebas de Toxicidad en Plantas

2.5.1. Bioensayo de Artemia Salina

Desde la década de los 30 el bioensayo con quistes de *Artemia salina*, se utiliza en acuicultura y su uso ha ido en aumento como alimento, además de ser utilizada como espécimen para realizar estudios ecotoxicológicos y toxicidad en plantas medicinales. Esto se debe a características que posee, entre las cuales la facilidad de adaptarse, sobrevivir en lugares donde se encuentre déficit de oxígeno, y la disponibilidad comercial de quistes (Meyer et al, 1982; Martin, 2015).

El modelo de *Artemia salina* muestra muy buena sensibilidad, además de económica para evaluar la toxicidad aguda de sustancias diversas tales como contaminantes, productos comestibles y farmacéuticos, productos químicos y extractos de plantas medicinales (Arencibia-Carballo et al, 2010).

La ventaja de este bioensayo es que los quistes de este crustáceo se pueden obtener en todo el año, ya que se produce y se comercializa como alimento para la Piscicultura.

2.5.2. Fundamento del ensayo de *Artemia Salina*

Este bioensayo se basa en la determinación de la concentración que causa la muerte al 50% de las larvas de artemias en 24 horas, bajo condiciones específicas. La muerte de las larvas se establece por falta total de movimiento durante 10 segundos en observación bajo el estéreo microscopio (Pino et al, 2010).

Este bioensayo debe estar bajo condiciones específicas para que los resultados tengan el menor margen de error, estas condiciones son:

- Temperatura de 1 ± 25 °c.
- El pH debe ser aproximado a 8
- Salinidad adecuada
- Oxigenación constante

Estas condiciones permiten que se dé una mayor eclosión de huevos de artemia, permitiendo tener mayor supervivencia las larvas a nivel de laboratorio (Reyes et al, 2016).

Este ensayo ha sido utilizado ampliamente en muchas plantas para estudiar su toxicidad ya que está estandarizado, siendo una prueba sencilla cómoda y económica, con resultados seguros, lo que permite que todas características hagan de este bioensayo confiable para estudios sobre la seguridad en el uso de la planta.

2.5.3. Morfología de la Artemia Salina

Artemia spp. Es un crustáceo braquiópodo del orden anostraca, y es el único género de la familia Artemiidae que habita en agua con altas concentraciones de sal.

Los adultos de la *Artemia* pueden medir entre 10 a 15 mm. Estos están desprovistos de caparazón y su cuerpo es transparente. Esta especie presenta razas partenogenéticas y anfígónicas. El adulto tiene patas planas en forma de hojas y una cola formada por los 8 últimos segmentos. En total, su cuerpo está dividido en 11 segmentos torácicos (llamados toracópodos), siete segmentos abdominales y dos o tres segmentos caudales con filamentos. Los toracópodos le sirven para nadar (Vanhaecke et al, 1980).

En los dos segmentos más próximos al tórax se encuentran los genitales, que son más voluminosos que los segmentos torácicos y abdominales.

El macho se diferencia por poseer un par de piezas prensiles (segundo par de antenas) en la región encefálica mientras que la hembra se reconoce por el saco de puesta o útero ubicado detrás del último toracópodo. Figura 4.

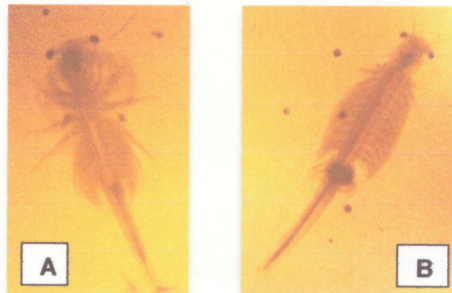


Figura 4. Ejemplares de *Artemia* adultos. A: Machos. Se observan piezas prensiles en la cabeza del macho. B. Hembras. Observése el saco de puesta característico en la hembra.

Fotografía: Meybis Pitti, 2020

El aparato circulatorio está formado por un corazón tubular alargado con un ostiolo en el extremo posterior y varios senos en diversas zonas del cuerpo. A través de este sistema circula hemolinfa, que contiene algunas células específicas y también

la hemoglobina. Los exopoditos de los toracópodos actúan como branquias lo que hace que la actividad locomotriz esté relacionada con la superficie respiratoria. En estos apéndices la cutícula es más delgada y sus cavidades están bien desarrolladas por lo que facilitan el contacto de la hemoglobina y el medio exterior (Vanhaecke et al, 1980).

2.5.4. Reproducción de Artemia Salina

Según las condiciones ambientales en que se encuentre, la Artemia tiene reproducción variada (reproducción partenogenética o reproducción sexual). En la reproducción partenogenética no hay fertilización, los huevos se acumulan en el útero por unos días, posterior son expulsados los huevos o quistes, estos están protegidos por una cubierta (corión) que tiene la capacidad de hidratarse y deshidratarse. Al hidratarse se inicia el metabolismo interno que permite la salida del nauplio al romperse el corión.

Cuando es un quiste el nacimiento del nauplio consta de dos fases:

- a) Preemergencia: el embrión rompe el corión y empieza asomar al exterior. En esta fase el embrión llega a estado de prenauplio.
- b) Emergencia: esta fase inicia cuando aún está en la membrana cuticular hasta que rompe dicha membrana y sale nadando libremente; culminado esto alcanza el estado de nauplio.

Cuando hay condiciones óptimas de alimento, oxígeno y salinidad el macho deposita el esperma en el saco de puesta de la hembra donde los huevos son fertilizados, esto es en la reproducción sexual. Ver figura 5

Las hembras de Artemia también pueden ser ovovivíparas, en donde el huevo o quiste tiene su desarrollo embrionario completo dentro del útero y al nacer están en estado de nauplio.

El nauplio puede llegar al estado de adultez entre 8 a 20 días después de la eclosión, en este tiempo pasa por cinco estadios post-larvales y 15 mudas aproximadamente.

La Artemia hembra puede producir hasta 300 nauplios o quistes cada cuatro días y puede llegar a vivir entre tres o cuatro meses.

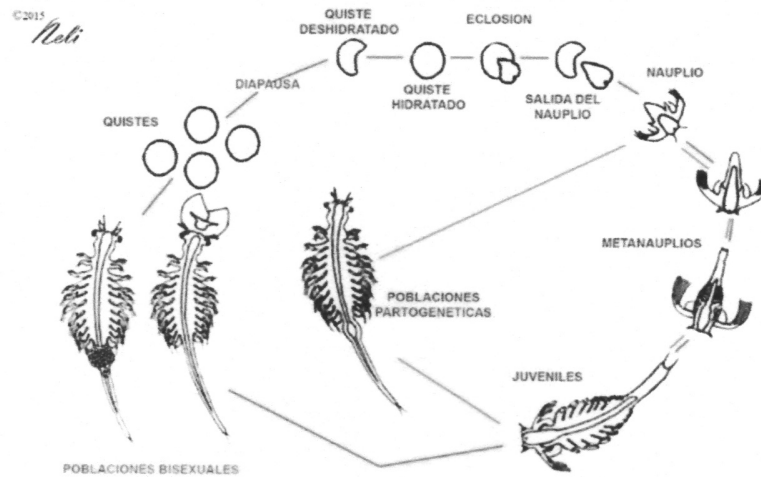


Figura 5. Ciclo vital en sus estados reproductivos.

Fuente: Martín N, 2015

2.5.5. Alimentación de la *Artemia Salina*

La artemia es un crustáceo filtrador y fagótrofo. Se alimenta de bacterias, algas unicelulares, pequeños protozoos y detritus del medio que captura por medio de actividad filtradora. Ingresado el alimento al atrio bucal pasa al esófago y recorre hasta un par de ventrículos globulares que se asimilan al estómago. Posterior el alimento ingresa al tubo intestinal y luego es eliminado por el ano (Lavens & Sorgeloos, 2000).

2.6. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA RATA

La función biológica más importante para una especie es la reproducción es por esto que a lo largo de la historia del hombre ha buscado solucionar los problemas referentes a esta función biológica, no solo para sí mismo, sino también para otros mamíferos de los cuales recibe recursos como alimentos y vestido, entre otros.

Una de las especies más utilizada para el estudio del sistema endocrino es la rata debido a que presenta un ciclo reproductivo (ciclo estral) corto de 4 o 5 días. Este mamífero presenta ovulación espontánea y poliéstrica que dura todo el año y no se requiere sobre estimulación nerviosa para darse la ovulación.

El ciclo estral de las ratas tiene dos incrementos de progesterona, uno preovulatorio en la tarde del proestro y otro post-ovulatorio dado en la fase metaestro. El incremento preovulatorio de progesterona se debe a la acción de la hormona LH mientras que el incremento post-ovulatorio de progesterona es por la secreción de esta hormona por los nuevos cuerpos lúteos formados, ver figura 7 (Freeman, 1994).

Las ratas con 5 días de ciclo estral se pueden diferenciar de las que tienen 4 días de ciclo por el incremento post-ovulatorio de progesterona, este se mantiene significativamente más alto durante la fase diestro; es decir, que la retención de los cuerpos lúteos prolonga por más tiempo la secreción de esta hormona y por lo tanto su función.

El ciclo estral consta de cuatro fases con características relevantes:

Proestro: se caracteriza por presentar células epiteliales uniformes con núcleo (Grasso et al, 1998); en esta fase se secretan grandes cantidades de estradiol y los folículos adquieren el estadio preovulatorio. La secreción de gonadotropinas es estimulada por el estradiol circulante. La LH produce la ovulación y la luteinización del folículo post-ovulatorio (Freeman, 1994).

Estro: es caracterizado porque predomina la presencia de células cornificadas y sin núcleo; se da la ovulación y el folículo post-ovulatorio comienza a estructurarse como cuerpo lúteo. Mientras tanto se empieza a desarrollar nueva serie de folículos,

por lo tanto, se produce un segundo pico de FSH tras darse la ovulación. Y el estrógeno es el responsable del comportamiento de la hembra durante esta fase.

Metaestro: en esta fase el epitelio vaginal presenta células cornificadas sin núcleos, leucocitos y células grandes y pequeñas con núcleo; la secreción de gonadotropina es inhibida por el estradiol secretado por el folículo y la progesterona producida por el cuerpo lúteo (Grasso et al, 1998).

Diestro: esta fase dura entre 48 a 57 horas. Disminuye el porcentaje de células cornificadas y aumenta el número de leucocitos. Se da inicio a la luteólisis siempre y cuando la copula no se haya efectuado y aumenta la secreción de estradiol por parte de los folículos en crecimiento, y se mantiene inhibida la secreción de gonadotropinas (Freeman, 1994).

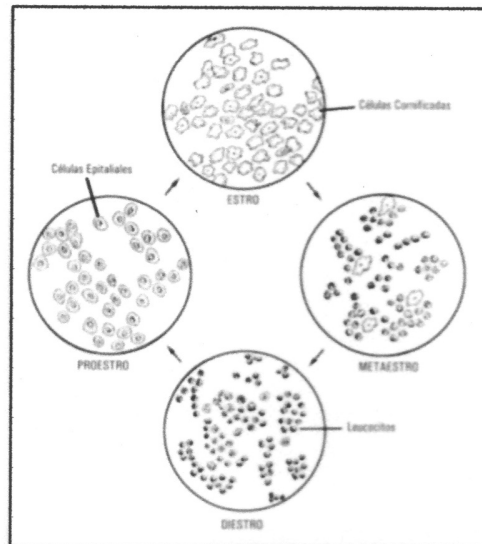


Figura 6. Células que aparecen en mayor proporción en el exudado vaginal de las ratas en las diferentes etapas (Galassi & Gullace).

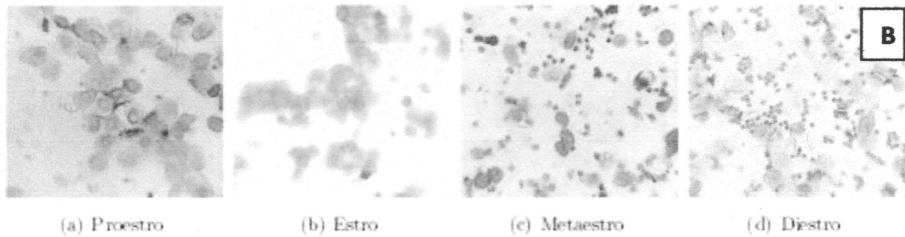
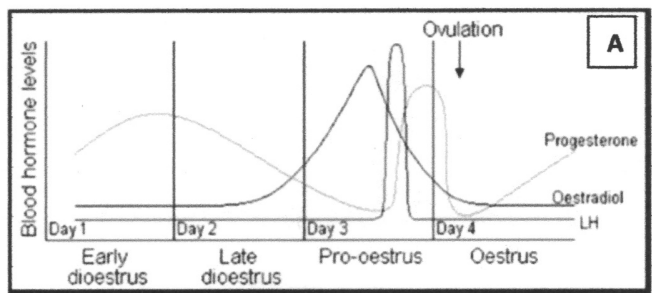


Figura 7. A: Ciclo estral de 4 días en la rata y nivel de las principales hormonas. B: citología vaginal.

2.7. Ciclo Reproductivo de la Mujer.

El ciclo menstrual de la mujer se presenta con una duración aproximada de 28 a 30 días permitiendo prepararse para la etapa de gestación y el mantenimiento óptimo de esta etapa. Este ciclo consiste en cambios morfo-funcionales que ocurren de manera periódica en los órganos sexuales femeninos (ovario y útero). Este ciclo es regulado por interacciones complejas del eje hipotálamo-hipófisis, ovarios y el aparato genital (Aguilar et al, 2017).

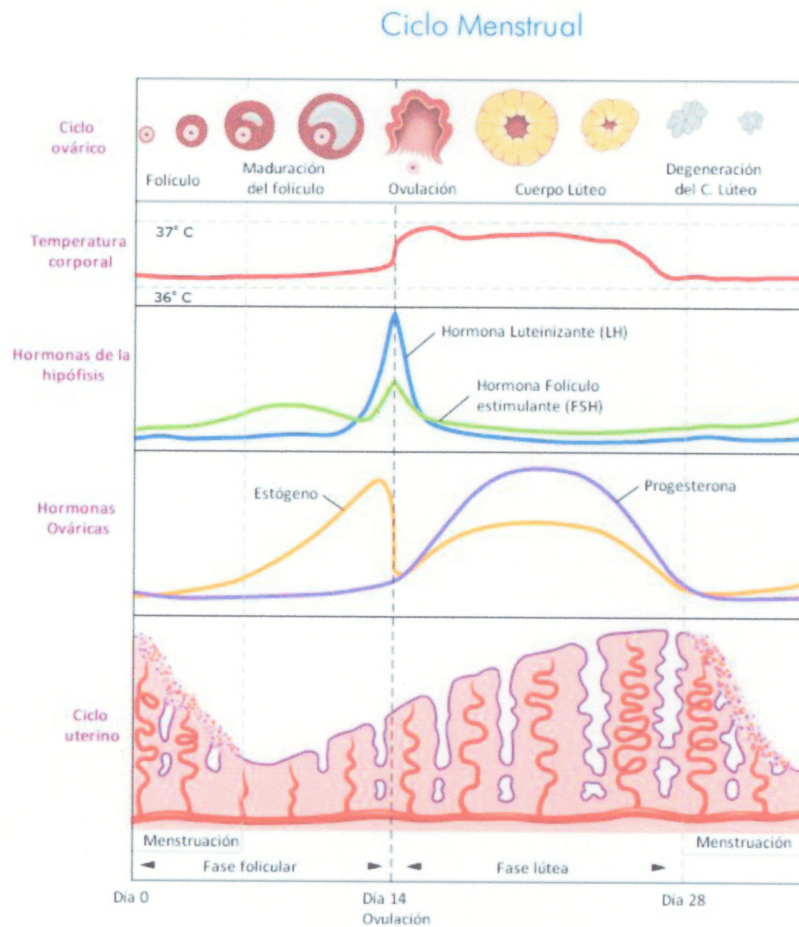


Figura 8. Fases del ciclo menstrual en la mujer y hormonas que determinan estas fases.

Fuente: Portal educativo.2009

2.7.1. Hormonas que actúan en el Ciclo Reproductivo.

Las hormonas sexuales femeninas producidas en el ovario son principalmente 17β -estradiol y progesterona. También se producen en pequeñas cantidades estrona, androstendiona, testosterona, 17α -hidroxiprogesterona y otras hormonas no esteroideas como la inhibina y relaxina (Tresguerres, 2010).

Estrógenos: es una hormona esteroidea que presenta tres estructuras (estrona, estradiol, estriol) los cuales sólo difieren entre sí por el número de hidroxilos que contienen. La principal hormona es el beta-estradiol y la estrona y el estriol pueden considerarse en algunas especies productos metabólicos del estradiol. Esta hormona influye en el desarrollo del óvulo en el ovario. La disminución de estrógeno circulante puede provocar cambios en el sistema nervioso que se manifiestan como alteraciones del humor, irritabilidad y depresión (Aguilar et al, 2017). Esta hormona también actúa en el metabolismo de grasas y colesterol en sangre. Las concentraciones de estrógenos son altas en la etapa del desarrollo fetal y durante la etapa reproductiva de la mujer y son muy bajas después de la menopausia.

Los receptores que median el efecto de los estrógenos son los receptores $ER\alpha$ y $ER\beta$ que se une al dominio LDB (ligand binding domain) y permite la liberación de proteínas chaperonas que producen la configuración del receptor. Esta unión y cambios en la configuración del receptor desencadenan el reclutamiento de proteínas co-reguladoras que activan o reprimen el gen específico para dicha hormona. Esta vía se conoce como "elemento de respuesta estrogénica" ERE" (Gracia, 2010).

Los receptores $ER\alpha$ son abundantes en el tracto reproductivo femenino (ovarios, útero, vagina). Además, se encuentran receptores α en las glándulas mamarias, hipotálamo, células endometriales y en el músculo liso vascular; mientras que los receptores $ER\beta$ se encuentran en la próstata y ovarios y en menor expresión en los pulmones, cerebro, huesos y vasculatura (Goodman & Gilman, 2019).

Otra vía para producir la actividad reguladora del gen estrogénico se conoce como vía alternativa o AP-1, en esta igualmente el estrógeno se une al receptor, pero

activa dos proteínas C-Jun y C-Fos, que activan los genes diana por un mecanismo que no se ha logrado explicar bien pero que requiere la presencia de una función conocida como AF-1 en el dominio A/B y de proteínas co-reguladoras. Esta función AF-1 puede activar los genes de transcripción en ausencia de estradiol (Gracia, 2010).

Progesterona: esta hormona se encuentra en todas las glándulas que forman esteroides (ovarios, corteza suprarrenal) y es responsable de los cambios en el útero para permitir la implantación del óvulo fecundado. Tiene un pico en la fase premenstrual como se observa en la figura 7. Esta hormona también tiene funciones reguladoras del desarrollo folicular, la ovulación y la liberación de las gonadotropinas pre-ovulatorias, debido a la interacción con los receptores de progesterona en el hipotálamo, glándula pituitaria y ovarios.

Las gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH) son secretadas en la adenohipófisis y los receptores de estas hormonas se encuentran en las gónadas debido a que su acción se realiza a este nivel. Los FSHR se encuentran en la membrana de las células granulosas del ovario. Esta gonadotropina es necesaria para el desarrollo folicular; mientras, que los LHR se encuentran en las células granulosas, células tecas y células intersticiales y luteales y dicha gonadotropina es necesaria para la maduración del oocito, la ovulación y luteinización del folículo (Outeriño, 2015).

La función hipofisaria de las gónadas está mayormente controlada por las hormonas esteroideas (estradiol y testosterona) que actúan a nivel hipotalámico y directamente en la hipófisis. De esta manera en las hembras, el patrón de secreción de FSH está controlado por un feed-back negativo de la hormona estradiol y la inhibina procedentes del folículo mientras que la secreción de LH está regulada por un feed-back positivo de los folículos y un feed-back negativo de la progesterona procedente del cuerpo lúteo (Rubianes, 2000).

2.8. Disrupción Endocrina

El sistema endocrino es el encargado de regular y coordinar actividades vitales para el organismo como el metabolismo, la reproducción, el desarrollo embrionario y fetal, entre otros. Esto lo realiza a través de sustancias químicas llamadas hormonas, y células receptoras (dianas) que actúan como un sistema de regulación y de comunicación complejo.

Las denominadas glándulas endocrinas reciben las señales, de células nerviosas u otras glándulas, producidas por diferentes estímulos externos. Estos estímulos estimulan la secreción de hormonas, según la demanda del organismo las cuales son liberadas a la sangre en concentraciones pequeñas (partes por billón), en donde son transportadas y distribuidas a diversos sitios del organismo en donde interaccionan con una célula receptor (diana) quien lee el mensaje y sigue las instrucciones para permitir una gran cantidad de respuestas y funciones biológicas. El cambio abrupto de concentraciones de hormonas puede producir alteraciones importantes en el organismo (Hernández, 2009).

Las hormonas pueden ser específicas o no específicas en su unión con la célula receptor. Como ejemplo las hormonas sexuales femeninas pueden unirse a receptores de estrógenos en el tejido mamario, óseo y del útero, y regular funciones en estos tejidos. La hormona se enlaza a la célula diana como una llave en una cerradura. Esta unión produce una cascada de reacciones según el tipo de hormona (Hernández, 2009).

Alteraciones en algún sistema hormonal dan lugar a disrupciones o disfunciones en la homeostasis. Cualquier sustancia que altere el adecuado funcionamiento de la homeostasis del organismo por alteración en los sistemas hormonales ha sido denominada "disruptor endocrino".

Estos disruptores no dependen estrictamente de su estructura química para tener esta actividad pues pueden alterar cualquiera de las diversas etapas de la actividad

hormonal, síntesis, distribución en el organismo, eliminación y luego a nivel de la interacción con los receptores. (Olea et al, 1996). En la figura 8 se ilustra un mecanismo de disrupción endocrina a nivel del receptor hormonal.

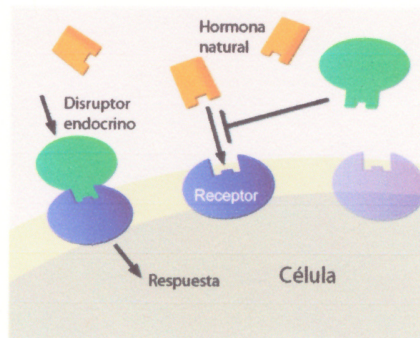


Figura 9. Mecanismo de disrupción endocrina.

Fuente: curiosoando.com

Los mecanismos de disrupción endocrina son variados y no se han definido totalmente por la gran cantidad de sustancias con diferentes estructuras químicas, además de trabajar o tener efecto a diferentes niveles en el organismo. Es así que un disruptor endocrino puede actuar a nivel del eje hipotálamo-hipófisis alterando la secreción de las hormonas gonadotropinas (actuar a nivel de las gónadas uniéndose en los receptores facilitando o deteniendo la secreción hormonal (estrógeno, progesterona, testosterona), a través de una actividad agonista o antagonista a nivel del receptor hormonal (Hernández, 2009). También es posible actuar a nivel de metabolismo de las hormonas impidiendo los niveles necesarios de estrógeno, u otras hormonas. Este metabolismo puede ser alterado en pasos metabólicos oxidativos de primera fase o a nivel de la conjugación principalmente de los procesos de sulfoconjugación o glucoronoconjugación (Gracia, 2010).

2.8.1. Actividad hormonal producida por metabolitos presentes en las plantas

Diversos estudios han demostrado que fitoestrógenos como las isoflavonas pueden llegar a tener actividad tanto estrogénica como anti-estrogénica, dependiendo de las concentraciones de estrógeno en el organismo. De esta manera, cuando hay concentraciones altas de estrógeno las isoflavonas tienen actividad anti-estrogénica, a diferencia de cuando las concentraciones de estrógeno son bajas estas sustancias actúan con actividad estrogénica. Esto se debe a que las isoflavonas pueden con los estrógenos endógenos para ligarse con el receptor de estrógeno (Makela et al,1995; Messina, 1999). Los fitoestrógenos en general tienen actividad estrogénica débil.

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1 PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS.

3.1.1. Recolección y secado.

Las plantas que se utilizaron para el estudio se recolectaron en la comunidad de Las Tinajas, Distrito de Dolega, Provincia de Chiriquí, Panamá. Las partes utilizadas de las plantas *Centaurum erythraea*, *Calophyllum brasiliense* y *Sirapuna guianensis* fueron toda la planta, corteza, y hojas respectivamente.

Fueron secadas a temperatura ambiente y posteriormente fueron trituradas con un molino de cuchillas. Se obtuvieron 100 g de peso seco para *C. erythraea*, 190 g para *C. brasiliense* y 89.9 g para *S. guianensis*.

3.1.2. Análisis físico

3.1.2.1. Determinación de cenizas totales: Se basa en la diferencia de pesos que se obtiene después de una calcinación de la droga vegetal.

Procedimiento: se enciende el horno con una temperatura entre 500 y 800°C. Se pesa un crisol y se anota su peso, se pesa de 2 a 4 g del material seco en el crisol y se anota su peso exacto. Se lleva el crisol al horno por una hora y se deja enfriar. Luego se pesa el crisol y se anota los valores. Se vuelve a colocar la muestra en el horno por 30 minutos y se repite el procedimiento para pesar la muestra hasta que no difiera el peso en unos 0.005g. se realiza la prueba por duplicado (Guillen P. & Sarmiento G., 2011).

$$\text{Cálculos: } CT = \frac{PMDC}{PMAC} \times 100$$

PMDC es peso de la muestra después de la calcinación

PMAC es peso de la muestra antes de la calcinación.

CT es cenizas totales.

3.1.2.2. Determinación de humedad: Se basa en la diferencia de pesos que se obtiene después de calentar la muestra en una estufa de 100-105°C.

Procedimiento: se calienta el horno a una temperatura de 100 a 105°C. Se pesa una capsula de porcelana y se anota los valores. Se pesa de 2 a 5 g de material seco y se anotan los valores respectivamente. Se coloca en el horno durante una hora y se dejó enfriar para luego pesar; se anotan los valores y se vuelve al horno por 30 minutos y se vuelve a pesar hasta que los pesos no difieran en menos de 5 mg. Se realiza la prueba por duplicado (Guillen & Sarmiento, 2011).

Cálculos: $H \frac{PMDD}{PMAD} X 100$

PMDD es el peso de la muestra después de la desecación

PMAD es el peso de la muestra antes de la desecación

H es la humedad.

3.1.3. Extracción de metabolitos secundarios

La materia seca se coloca en una solución de hidroalcohólica en proporción 30:70 a excepción del extracto de *C. brasiliense* en donde la proporción a utilizar fue de 20% de agua y 80% de etanol; por cada 100ml de solución hidroalcohólica se agregan 10 g de materia seca; estas soluciones se mantuvieron en constante agitación durante 10 días. Pasado este tiempo se filtra con una bomba al vacío (VACUM PRES).

El filtrado del extracto se concentra en un rotavapor (modelo BUCHI R-210) con 40 °c de temperatura y a una presión atmosférica entre 50-60 bar; se lleva a un volumen entre 20 a 35 ml.

3.1.4. Concentración de los Extractos

Se pesó un vaso químico seco y vacío. Luego se midieron 5 ml de extracto en una probeta de 5 ml. Se pasaron los 5 ml del extracto al vaso químico y se llevaron a evaporación en una plancha de calentamiento. Luego se dejó enfriar se pesaron los Se anotaron todos los valores. El procedimiento se repitió hasta lograr un peso constante.

Para determinar la concentración final del extracto se utilizó la siguiente ecuación:

$$C = \frac{m}{v}$$

En donde:

C = concentración del extracto.

M = masa (peso del extracto evaporado)

V = volumen (volumen del extracto evaporado)

La concentración obtenida es multiplicada por el volumen total del extracto para determinar cuánto hay del peso seco de la planta en el volumen obtenido al final.

Este procedimiento se realizó con cada uno de los extractos.

Con los valores obtenidos de la concentración y el peso seco inicial del extracto se determina el porcentaje de rendimiento con la fórmula:

$$\%R = \frac{\text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

3.2. Tamizaje fitoquímico

Se realizaron pruebas rápidas para la identificación de metabolitos secundarios presentes en los extractos preparados de las plantas *Centaurium erythraea*, *Calophyllum brasilienses* y *Sirapuna guianensis*. Los reactivos utilizados fueron preparados en el laboratorio de CIPNABIOT (Ver anexos).

Las pruebas realizadas fueron:

3.2.1. Identificación de alcaloides

El extracto se diluye en HCl al 10%, después se toma 1ml y se coloca en un tubo de ensayo, luego se añade 2-3 gotas del reactivo (Dragendorff), se observan los resultados; esto se hace con cada uno de los extractos (Patiño, 2016). El mismo procedimiento se realiza con los reactivos de Wagner y Mayer.

3.2.2. Pruebas para identificación de esteroides, terpenos y triterpenos

Liebermann-Buchard: a cada extracto se le agrega 1 o 2 ml de anhídrido acético y 2 gotas de H₂SO₄ conc. por las paredes del tubo. Observar si hay cambio de coloración.

Salkowski: se agrega 1 ml de extracto en un tubo de ensayo, al extracto se agrega 0.5 ml de cloroformo y posteriormente se añadió un par de gotas de H₂SO₄ concentrado por las paredes del tubo. Se agitó y dejó reposar (Patiño, 2016).

3.2.3. Pruebas para identificación de flavonoides.

Shinoda: en un tubo de ensayo se colocar cada extracto respectivamente y posterior agregarle un pedacito de Mg y unas gotas de HCl concentrado y calentar. La aparición de coloración magenta da positivo a flavonoides.

Salkowski: se realiza el mismo procedimiento que el antes mencionado. Si hay una coloración naranja-amarillo es positivo para antocianinas y si es una coloración naranja-rojizo es positivo para flavononas (Patiño, 2016).

3.2.4. Pruebas para identificación de taninos.

Gelatina-sal: preparar una solución de gelatina al 1% disuelta en una solución de sal al 10%. Se agrega 1 ml de la solución de gelatina-sal a 1 ml en el tubo de ensayo de cada extracto respectivamente. Si se forma un precipitado blanco, la prueba es positiva.

Acetato de plomo al 10%: en un tubo de ensayo colocar 1ml del extracto y agregar 2 o 3 gotas del reactivo de acetato de plomo al 10%. La formación de precipitado blanco da positivo la prueba para taninos.

Prueba de cloruro férrico (FeCl₃) al 5%: colocar 1 ml de extracto a un tubo de ensayo, posteriormente agregarle 2 o 3 gotas del reactivo. Si hay cambio de coloración violeta a negro oscuro es positivo para compuestos fenólicos (Patiño, 2016).

3.2.5. Pruebas de identificación de glucósidos.

Baljet: agregar de 2 o 3 gotas del reactivo a un 1ml del extracto contenido en un tubo de ensayo. El resultado de una coloración rojo vino da positivo para glucósidos cardiotónicos.

Prueba de legal: en un tubo de ensayo colocar 1 ml del extracto, agregar unas gotas de hidróxido de sodio al 10% y posterior añadir 1 ml de una solución de nitroprusiato de sodio. La aparición de una coloración de rosado intenso a rojo sangre da positivo a estos compuestos. (Patiño, 2016)

3.2.6. Prueba para identificación de saponinas

En tubo de ensayo se coloca 1ml del extracto y se agrega 9ml de agua. Se agita vigorosamente por unos segundos y se deja reposar por 15 minutos; posterior a esto se mide la altura de la espuma sobrenadante en el tubo de ensayo para determinar la proporción de saponinas.

Menos de 5 mm no se detectan saponinas

Altura de 5-9 mm es igual a un contenido bajo

Altura de 10-14 mm es igual a un contenido medio

Altura mayor de 15 mm es igual a un contenido alto

3.2.7. Prueba de identificación de cumarinas:

En un papel filtro se agrega con un capilar el extracto, posterior se le agrega hidróxido de sodio NaOH, el extracto cambiará a un color amarillo. Pasado esto se le agrega ácido clorhídrico HCl. Si en el papel desaparece la coloración amarilla hay presencia de cumarinas.

3.3 Procedimiento para bioensayo de toxicidad en Artemia Salina.

3.3.1. Procedimiento general

Para realizar estas pruebas se utilizaron nauplius de *Artemia Salina* (48 a 72 horas de eclosionados). Se mantuvieron en las condiciones establecidas para este bioensayo.

Condiciones generales del medio de cultivo de *Artemia Salina*:

- pH del medio no menor a 8.0.
- Luminosidad (24 horas al día).
- Salinidad (solución de sal cruda 38 g de sal cruda por cada litro de agua)
- Oxigenación continua (Bomba Air Tech 2K2).
- Temperatura (23 a 25 °c)
- Humedad relativa (65 a 67%)

3.3.2. Eclosión de los huevos de *Artemia Salina*.

Los quistes de *Artemia* se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 5% (2 ml de cloro en un litro de agua dulce) se colocan los quistes en la solución de lejía por 20 minutos, posterior se filtran y se lavan los quistes. (Ver figura 9)



Figura 10. Eclosión de los quistes.

Se puede observar la eclosión de los quistes en las óptimas condiciones.

Fotografía: Meybis Pitti, 2020

3.3.3. Preparación del medio de eclosión.

Se utilizaron 4 peceras con capacidad de un litro de agua. Se utilizó agua de pozo brocal libre de cloro u otro contaminante, la cual se mantuvo a temperatura de 23 a 25 °C dentro del laboratorio. Por cada litro de agua se añadieron 38 g de sal cruda y 1 g de bicarbonato de sodio para mantener el pH entre 8 a 8.5 manteniendo este medio bajo aireación continua (Ver figura 10).

En cada pecera se colocaron 2 g de huevos de artemia. Los quistes eclosionaron en un periodo de 24 a 48 horas.



Figura 11. Medio de donde eclosionaron los quistes de Artemia.
fotografía: Meybis Pitti, 2020

3.3.4. Alimentación de *Artemia Salina*.

El cultivo de *Artemia Salina* se alimentó el primer día después de su eclosión. Se utilizaron 5 g de alimento y se disolvieron en 5 ml de agua destilada; se vertió 1 ml en cada pecera.

3.3.5. Metodología general para el ensayo de toxicidad con *Artemia Salina*.

Se utilizaron nauplios de *Artemia Salina* entre 48 a 72 horas después de su eclosión y procurando que los seleccionados presentaran un tamaño similar; (Ver Figura 11). Para seleccionar los nauplios a utilizar se asieron con un gotero con la suficiente apertura para no lesionarlos al momento de colectarlos y posteriormente se colocaron en los recipientes respectivos para el ensayo.

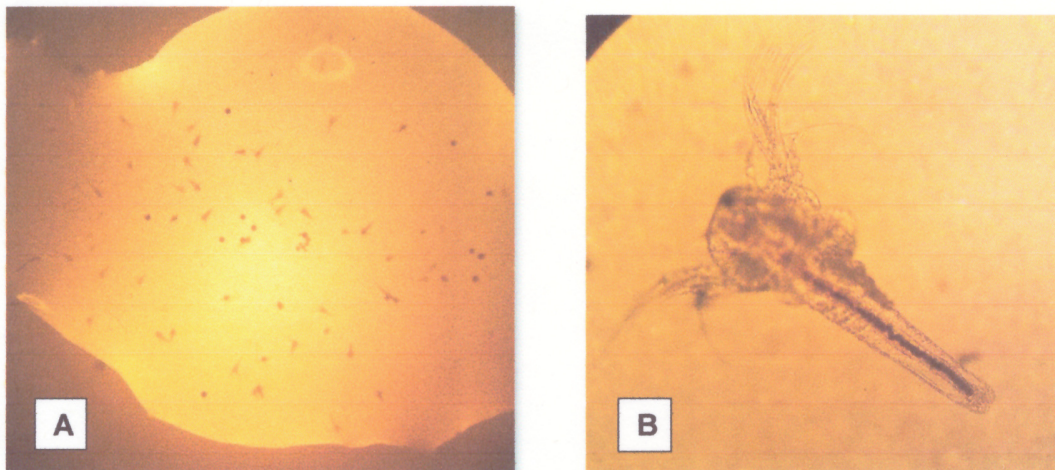


Figura 12. Especimen de nauplios. En la figura A se observa nauplios colectados con el gotero. En la figura B se puede observar un espécimen de nauplio de *Artemia Salina* con 48 horas de eclosión
Fotografía: Meybis Pitti, 2020

3.4 Determinación de la toxicidad Aguda en el modelo de *Artemia Salina*

Se forman grupos de 10 nauplios en recipientes plásticos con capacidad de 25 ml. Estos grupos son expuestos a diferentes concentraciones de los extractos anteriormente preparados. También se forma un grupo control solo expuesto al medio salino. La toxicidad aguda es determinada transcurridas 24 horas de exposición a las diferentes concentraciones de los extractos. Se cuantifica el número de muertos (es considerado muerto el organismo cuando no se observa movimiento durante 10 segundos aproximadamente) y se calcula el porcentaje de muerte para cada concentración. El % de decesos en cada grupo se determina. Para el análisis el % de decesos se transforman a Unidades Probit y se relacionan con la concentración del extracto prueba (Ver figura 12).

Las diferentes concentraciones fueron transformados a logaritmo de concentración. Posteriormente se calculó la concentración letal 50 (CL50) mediante el método de *Probit* (Gutiérrez, 1984). Los resultados y curvas dosis respuesta fueron analizados utilizando el Programa Graph Pad Prism versión 7.00.

Se realizaron 3 réplicas por cada concentración.



Figura 13. Sistema de aireación para el ensayo de toxicidad aguda con nauplios de *Artemia Salina*. Un grupo control y 7 concentraciones con 3 réplicas cada uno.

Fotografía: Meybis Pitti, 2020

3.4.1. Determinación de la Toxicidad Aguda del extracto de *Centaureum erythraea*.

Se preparó una solución madre del extracto *C. erythraea* de 222.1 mg/ml. A partir de esta solución madre se prepararon las diferentes concentraciones finales; se prepararon en total 7 concentraciones entre 6,000 μg y 100,000 μg (Ver figura 13).

El volumen del medio de las concentraciones finales de cada grupo de estudio fue de 10 ml.

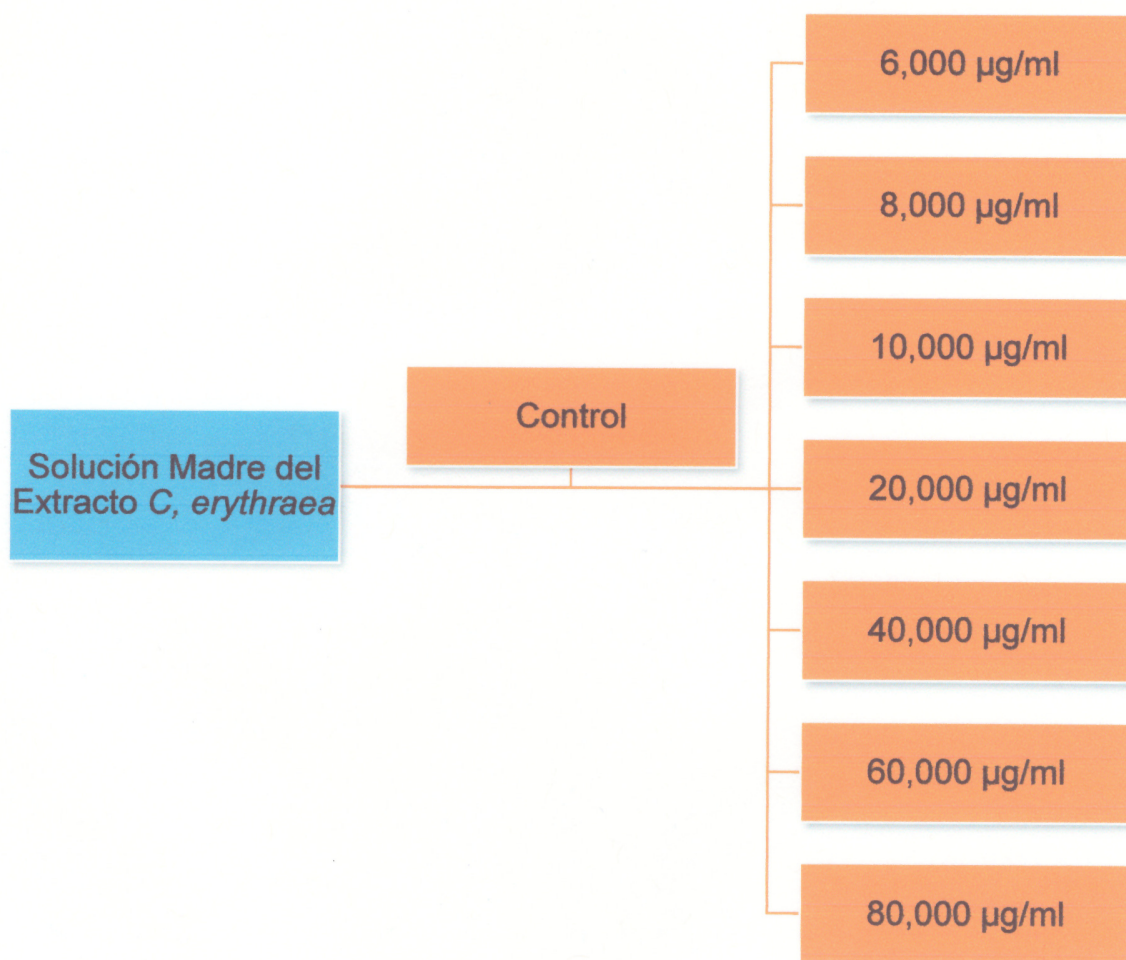


Figura 14. Concentraciones finales del extracto *C. erythraea*.

Se realizaron 3 réplicas de cada concentración.

3.4.2. Determinación de la toxicidad aguda del extracto de *Calophyllum brasiliense*.

Se preparó una solución madre del extracto *C. brasiliense* de 15 mg/ml. A partir de esta solución madre se prepararon las diferentes concentraciones finales. Se prepararon en total 7 concentraciones entre 10 µg hasta 1000 µg (Ver figura 14).

El volumen final para todas las concentraciones probadas fue de 10 ml.

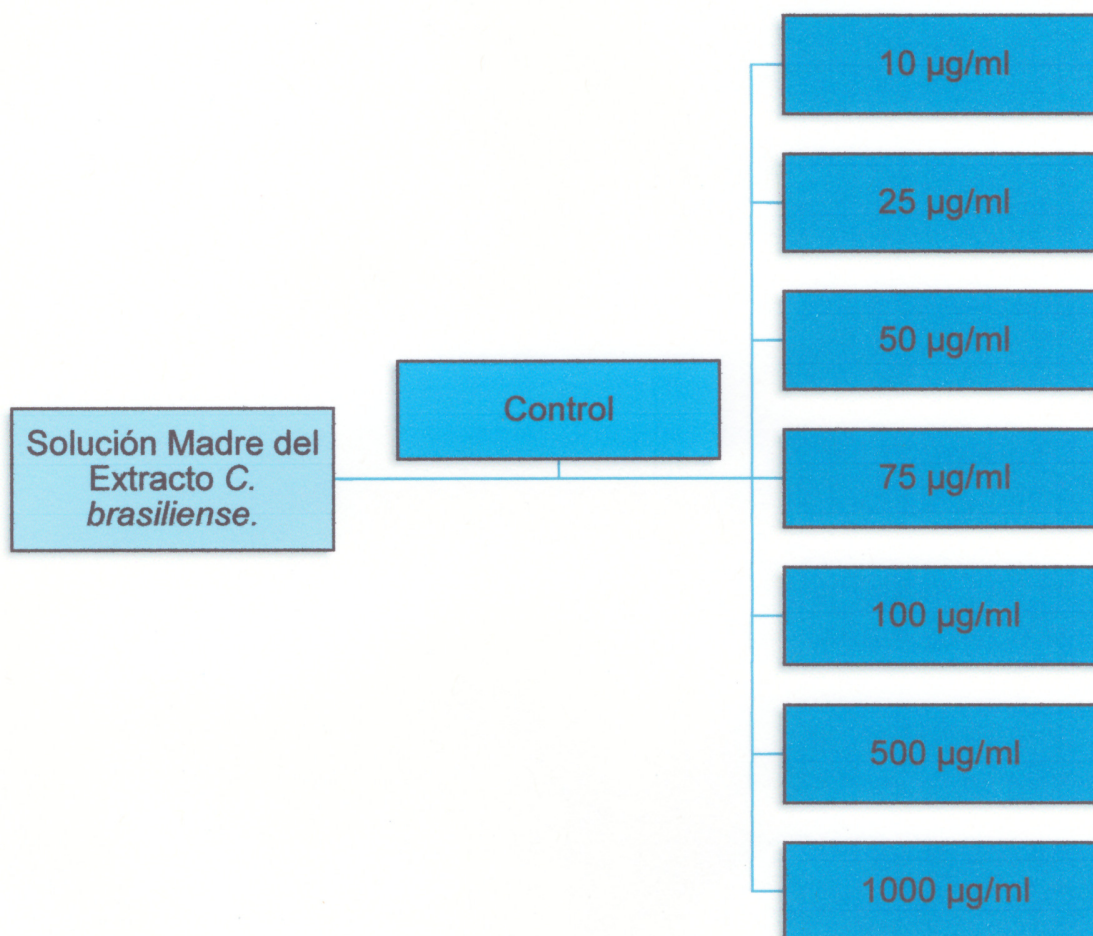


Figura 15. Concentraciones finales del extracto *C. brasiliense*.

Se realizaron 3 réplicas de cada concentración.

3.4.3. Determinación de la toxicidad aguda del extracto de *Sirapuna guianensis*.

Se preparó una solución madre del extracto *S. guianensis* de 15 mg/ml. A partir de esta solución se prepararon las diferentes concentraciones finales. En total se prepararon en total 7 concentraciones entre 10 µg hasta 1000 µg (Ver figura 15). El volumen final para todas las concentraciones probadas fue de 10 ml.

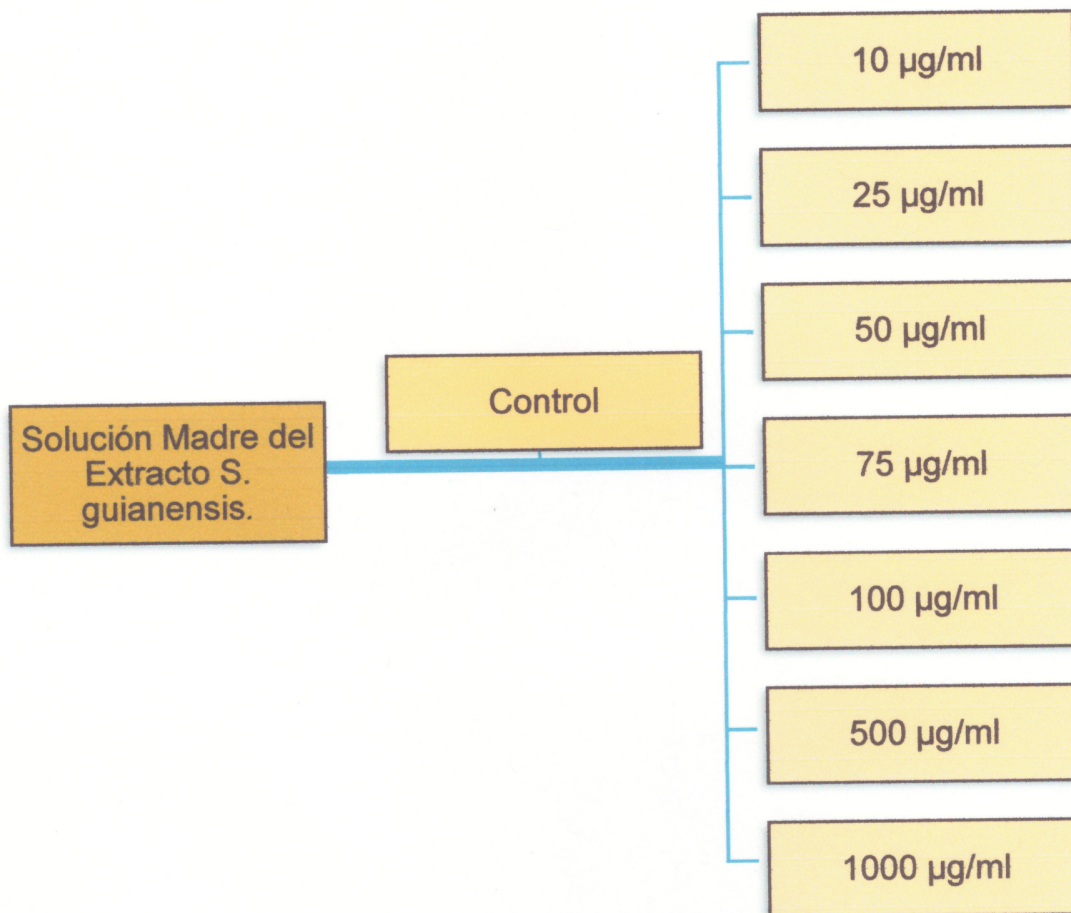


Figura 16. Concentraciones finales del extracto *S. guianensis*.

Se realizaron 3 réplicas de cada concentración.

3.5 Efecto de la Administración Intraperitoneal del Extracto de *Calophyllum brasiliense* sobre la citología vaginal de ratas Wistar adultas.

3.5.1. Procedimiento general.

Sujeto: Se utilizaron ratas Wistar no ovariectomizadas, de 3 a 5 meses de edad con peso entre 190 g y 325 g. Los animales fueron obtenidos del Bioterio del Laboratorio de Ecotoxicología, de la Universidad Autónoma de Chiriquí. Fueron mantenidas en condiciones estándares con periodos de luz-oscuridad de 12 horas, temperatura entre 21°C a 25°C, humedad entre 60% a 65%.

Ganancia de peso: El peso se determinó diariamente en cada uno de los individuos. La ganancia de peso se determinó como porcentaje del peso registrado al inicio del tratamiento.

Citología vaginal: Diariamente se evaluó el tipo de células en el frotis vaginal entre las 9:00 y 11:00 de la mañana. Brevemente el procedimiento fue el siguiente: Mediante un gotero con aproximadamente 0.5 ml de solución salina estéril, se realizó un lavado vaginal. Se tomó una muestra del mismo, la cual fue colocada en un portaobjeto, y se observó en el microscopio (Bresser researcher Bino 40-1000x) a una ampliación de 10X El tipo de células predominantes en el frotis sirvió de base para la determinación de la fase estral (Proestro, estro, metaestro y diestro). Se evaluó el porcentaje de células predominante en relación con la concentración del extracto administrada en el grupo correspondiente.

3.5.2. Diseño experimental

Se formaron 5 grupos de 4 ratas no ovariectomizada a los que se les administró concentraciones progresivas del extracto de *C. brasiliense* y un grupo control al que solo se le administró el vehículo (solución salina).

Se realizó el frotis todos los días para determinar el ciclo estral de las ratas, durante 4 ciclos continuos. Antes de empezar el tratamiento se hizo una observación similar para determinar el tipo de ciclo de cada rata, esto es si tenían ciclos estrales normales de 4 o cinco días. Logrado esto se empezó la administración del extracto por la vía intraperitoneal.

Las dosis para observar los efectos en la citología vaginal fueron de 25, 50, 70 y 85 mg/kg de peso. Y las dosis utilizadas para observar patrón de toxicidad fueron de 25, 50, 85, 100 y 150 mg/kg; para este ensayo se utilizaron grupos de 4 ratas cada uno.

Se preparó una solución madre diariamente con una concentración de 60 mg/ml del extracto en solución salina estéril, Las dosis para cada animal se calcularon en base a peso, para tener un máximo volumen de inyección de solución final de 1 ml.

El periodo de tratamiento fue de 21 días observándose los cambios en el patrón de células del frotis con respecto a la concentración del extracto administrado. Se evaluó además los cambios con respecto a la fase estral en que se inició el tratamiento (Proestro, metaestro y diestro).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3 Análisis Físico de las Plantas. Pruebas de calidad

4.1.1 Cenizas totales.

Tabla 4. Cenizas totales.

Planta	1 ^{ra} Repetición (%)	2 ^{da} Repetición (%)	Promedio (%)
<i>C. erythraea</i>	26.5	21.5	24
<i>C. brasiliense</i>	30	26.5	28.25
<i>S. guianensis</i>	21	23	22

Fuente: Meybis Pitti, 2020

En la tabla 4 se observan los resultados obtenidos de cenizas totales de cada una de las plantas en estudio. Este proceso se hizo por duplicado. El porcentaje de cenizas totales es la cantidad de materia inorgánica que queda después de ser quemado la materia orgánica, es decir que las cenizas totales son los minerales que contiene la planta en estudio (Guillen & Sarmiento, 2011).

No se encontró en la literatura datos sobre prueba de cenizas totales de cenizas totales para las plantas evaluadas en este estudio. Se observa que todas mostraron alta cantidad de minerales. Generalmente las partes de la planta que contienen más alto contenido de minerales son la corteza. Esto es coincidente con los resultados observados en *C. brasiliense*, el cual mostró mayor contenido de cenizas totales de las plantas estudiadas.

4.1.2 Porcentaje de humedad.

Tabla 5. Porcentaje de humedad.

Planta	1 ^{ra} Repetición (%)	2 ^{da} Repetición (%)	Promedio (%)
<i>C. erythraea</i>	12	13	12.5
<i>C. brasiliense</i>	15	13	14
<i>S. guianensis</i>	11	12	11.5

Fuente: Meybis Pitti, 2020

El porcentaje de humedad al igual que el porcentaje de cenizas son pruebas de calidad que reflejan si una muestra ha sido adulterada o dañada.

Para la referencia de porcentaje de humedad se utiliza un valor de 14%. Un valor mayor puede indicar que la muestra puede estar propensa a proliferación de hongos u otro microorganismo o que los componentes químicos que contienen se descompongan, perdiendo así sus propiedades (Guillen & Sarmiento, 2011).

El % de humedad en las muestras secas de las plantas en estudio no pasaron de 14%. Por lo que se puede decir que las muestras fueron aptas para los posteriores estudios realizados.

4.2 Concentración final de los extractos.

Tabla 6. Concentración de los extractos.

Extracto	Resultados
C. erythraea	$C = \frac{3.47g}{5ml} = 0.694 g/ml$ $m = (0.694g/ml)(36ml)$ m= 24.98 g
C. brasiliense	$C = \frac{6.01g}{5ml} = 1.202 g/ml$ $m = (1.202g/ml)(25ml)$ m=30.05g
S. guianensis	$C = \frac{3.01g}{5ml} = 0.602 g/ml$ $m = (0.602 g/ml)(15.5ml)$ m= 9.331 g

Los valores de masa son expresados en gramos de peso seco.

C: concentración de extracto; m: masa

Fuente: Meybis Pitti, 2020

Tabla 7. Porcentaje de Rendimiento de los Extractos.

Porcentaje de Rendimiento			
Planta	<i>C. erythraea</i>	<i>C. brasiliense</i>	<i>S. guianensis</i>
Ecuación	$\%R = \frac{24.98g}{100.02g} \times 100$	$\%R = \frac{30g}{190g} \times 100$	$\%R = \frac{9.331g}{89.9g} \times 100$
Resultado	24.97%	15.79%	10.38%

%R: porcentaje de rendimiento

Fuente: Meybis Pitti, 2020

4.3 Marcha Fitoquímica

Tabla 8. Resultados obtenidos en las pruebas de tamizaje fitoquímico.

Metabolito Secundario	Prueba Química	Indicador	Resultados		
			C. e.	C. b.	S. g.
ALCALOIDES	Mayer	Precipitado amarillo blancuzco	+	+++	+++
	Wagner	Precipitado chocolate-rojizo	+	+++	+
	Dragendorff	Precipitado negruzco	+	+	++
TERPENOS	Salkowski	Amarillo o rojo	+	+	+
ESTEROLES Y TRITERPENOS	Liebermann-Buchard	Coloración azul, verde, rosa o gris	+ Verde débil	+++ Rojo	+ Rojo débil
FLAVONOIDES	Shinoda	Coloración magneta	----	++	+
	Salkowski	Antocianinas: naranja amarillo Flavononas: naranja rojizo	----	++ naranja rojizo	----
TANINOS	Gelatina-sal	Precipitado blanco	+	+++	++
	Acetato de plomo al 10%	Precipitado blanco	+++	+++	++

	FeCl ₃	Coloración violeta a negro oscuro	+++	+++	+
GLUCÓSIDOS	Baljet	Coloración rojo vino	++	+++	++
	Prueba legal	Coloración rosado intenso a rojo sangre	++	+++	++
SAPONINAS	Prueba de espuma	Altura de espuma	8 mm	15 mm	18 mm
		sobrenadante	+	+++	+++
CUMARINAS	Prueba de neutralización	Desaparición de coloración amarilla	+	++	+
Leyenda:					
--- : Ausencia					
+ : Poca Presencia					
++ : Moderada Presencia					
+++ : Abundante Presencia					

C. e. = extracto de *Centaurium erythraea*

C. b. = extracto de *Calophyllum brasiliense*

S. g. = extracto de *Sirapuna guianensis*

Fuente: Meybis Pitti, 2020

En la tabla 8 se puede observar que el extracto que muestra mayor presencia de los metabolitos secundarios en general es el extracto *C. brasiliense*. Aunque este tamizaje fitoquímico fue solo cualitativo brinda información de las posibles acciones biológicas que tengan estas plantas, teniendo en cuenta que el efecto de un metabolito secundario en un extracto de planta es dependiente de la concentración que se encuentra en dicho extracto.

La *C. erythraea* muestra menor presencia de metabolitos secundarios en comparación de las demás plantas en estudio; según el tamizaje realizado muestra mayor presencia de taninos y glucósidos y escasa presencia de alcaloides, saponinas, y compuestos fenólicos como terpenos esteroides y triterpenos. Además, en las pruebas para determinar presencia de flavonoides no hubo resultados positivos, aunque en algunos estudios consultados en la literatura si han observado presencia de flavonoides (Natural Herbs, 2015).

Una posible causa para explicar la diferencia de resultados de flavonoides en el extracto de *C. erythraea* realizado y los estudios consultados sobre esta planta pueden ser por el ambiente en que se encuentra la planta; es decir, la cantidad de metabolito secundario encontrado en una planta puede ser afectado por el entorno que se encuentre (clima, cantidad de agua, nutrientes en el suelo, etc.). Esto podría explicar la causa por la que en el tamizaje realizado no se determinó presencia de flavonoides.

Según los resultados obtenidos para esta planta (*C. erythraea*) en el tamizaje fitoquímico se podría tener actividad astringente por la presencia abundante de taninos y también actividad antioxidante por la mezcla de metabolitos secundarios a los que se les atribuye esta actividad tales como los taninos y compuestos fenólicos (Bruneton, 1999).

A las xantonas C-glicosiladas se les atribuye efectos beneficiosos sobre enfermedades vesículo-biliares y las xantonas O-glicosiladas han mostrado eficacia en el tratamiento de algunos tipos de hepatitis (Zhang, 1999).

El extracto de *C. brasiliense* muestra abundante presencia de todos los metabolitos secundarios evaluados en el tamizaje realizado. Mostró sin embargo poca presencia de terpenos, pero en cuanto a triterpenos y esteroides, saponinas, glucósidos, alcaloides y taninos muestra abundante presencia de estos, y una moderada presencia de flavonoides.

Estudios de esta planta han mostrado varios efectos farmacológicos, los cuales podrían estar asociados con la gran variedad de metabolitos secundarios que

contiene, lo que hemos confirmado en este estudio en los que encontramos alta presencia de saponinas y cumarinas. Esta planta ha sido asociada con alta citotoxicidad. Este efecto podría asociarse con la presencia de cumarinas; en estudios anteriores, las cumarinas presente en esta planta han sido fuente de investigación contra enfermedades como el VIH y cáncer (García et al, 2014). En la prueba de Salkowski para flavonoides el resultado fue positivo para flavononas dando una coloración naranja-rojizo, por lo que puede haber posibilidades de presencia de isoflavonas, sustancias consideradas como fitoestrógenos.

En el extracto de la planta *S. guianensis*, el tamizaje fitoquímico indicó que el metabolito secundario más abundante fueron las saponinas (18 mm en prueba de espuma) por lo que hay posibilidad de que tenga actividad citotóxica y hemolítica (Bruneton, 1999). En cuanto a flavonoides, no mostró presencia significativa en este estudio.

4.4 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DE LOS EXTRACTOS SOBRE EL BIOENSAYO DE NAUPLIOS DE *ARTEMIA SALINA*

Preparación del medio de eclosión y mediciones de las variables estándares del medio

Para preparar el medio de cultivo se añadieron 38 g de sal cruda y 1 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) a un litro de agua dulce.

Tabla 9. Medición de parámetros en el medio de cultivo de *Artemia salina*.

Parámetro	Medición
Temperatura	23.7 °c
Conductividad	19.99 mS
TSD	10.00 mS
pH	8.54

TSD: solidos totales disueltos (Son la suma de minerales, sales, metales, cationes, o aniones disueltos en el agua). Fuente: Meybis Pitti, 2020

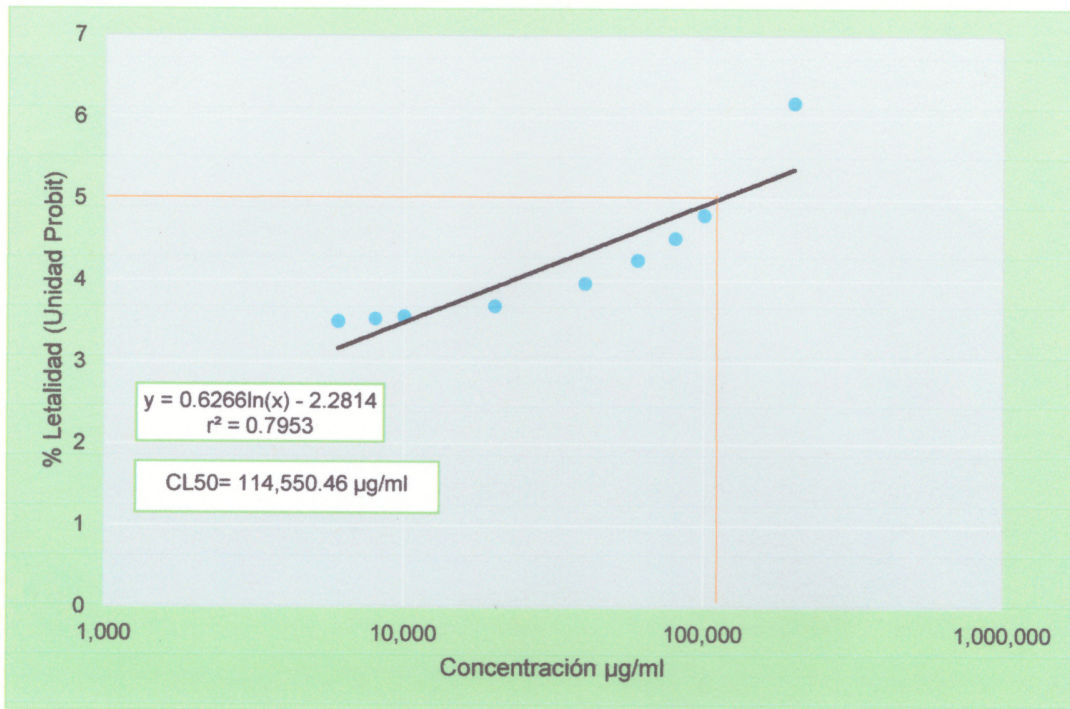
4.4.1 Toxicidad aguda del Extracto hidroalcohólico de la *C. erythraea* en nauplios de *Artemia salina*

Tabla 10. Porcentaje de letalidad (unidades *probit*) de *Artemia salina* después 24 horas de exposición al extracto de *Centaurium erythraea*.

Concentración de <i>C. erythraea</i> µg/ml	Log Concentración <i>C. erythraea</i>	% Letalidad en <i>Artemia Salina</i> (Probit)			Promedio ± Desviación Estándar (Probit)	y estimada	x estimada
Control	0	0	0	0	0		
6,000	3.78	0	0	0	0	3.50	4.67
8,000	3.90	0	0	0	0	3.53	4.68
10,000	4	0	0	0	0	3.56	4.69
20,000	4.3	0	0	0	0	3.69	4.71
40,000	4.6	4.16	3.72	4.16	4.01 ± 0.21	3.97	4.77
60,000	4.78	3.72	4.16	4.48	4.12 ± 0.31	4.25	4.83

80,000	4.9	4.75	4.75	4.48	4.66 ± 0.13	4.52	4.89
100,000	5	4.75	4.75	4.75	4.75 ± 0	4.8	4.95

Fuente: Meybis Pitti, 2020



Gráfica 1. Toxicidad aguda del extracto de *C. erythraea* en nauplius de *Artemia salina* de después de 24 horas de exposición.

Los resultados obtenidos en el bioensayo de *Artemia Salina* para el extracto de la planta *C. erythraea* se muestran en la Tabla 10. Basados en los estudios realizados en citotoxicología en extracto de plantas (meyer et al, 1982), y debido a que las concentraciones con las que se alcanzó la CL50 para este extracto fue muy alta (114,550.46 µg/ml) puede considerarse que no existe toxicidad significativa para este extracto en este tipo de ensayo.

Según Meyer et al, (1982) los extractos de plantas se consideran no tóxicos o que no tienen actividad citotóxica significativa si presentan una CL50 > 1000 $\mu\text{g/ml}$. Los extractos con un CL50 <1000 $\mu\text{g/ml}$ se consideran significativamente tóxicos.

El extracto hidroalcohólico de la *C. erythraea* tiene un CL50 muy alto con respecto a los valores de considerados tóxicos.

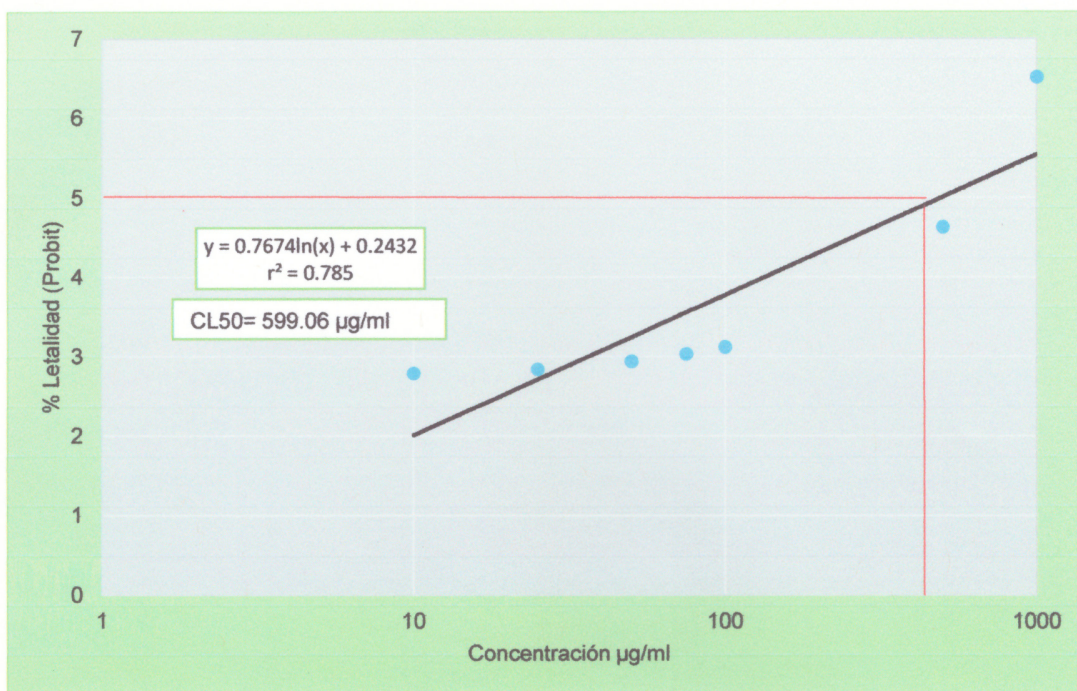
En la revisión bibliográfica realizada por nosotros no encontramos referencia con respecto a la toxicidad del extracto *C. erythraea* en el bioensayo de *Artemia Salina* esta. Estos resultados podrían ser explicados con los datos que encontramos en el tamizaje fitoquímico, pues se observó poca presencia de metabolitos secundarios que en teoría se asocian con ciertos efectos tóxicos tales como las saponinas, alcaloides, cumarinas o taninos (Ramos et al, 1998; Sepulveda et al, 2003)

4.4.2 Toxicidad Aguda del extracto de *Calophyllum brasiliense* en nauplios de *Artemia salina*.

Tabla 11. Porcentaje de Letalidad (Unidades *Probit*) de *Artemia salina* después de 24 horas de exposición al extracto *Calophyllum brasiliense*.

Concentración de <i>C. brasiliense</i> $\mu\text{g/ml}$	Log Concentración <i>C. brasiliense</i>	% de Letalidad en <i>Artemia salina</i> (<i>Probit</i>)			Promedio \pm Desviación Estándar	y estimada	x estimada
Control	0	0	0	0	0		
10	1	0	0	3.72	1.24 \pm 1.75	2.79	1.03
25	1.4	3.72	3.72	0	2.48 \pm 1.75	2.84	1.38
50	1.7	3.72	0	3.72	2.48 \pm 1.75	2.94	1.7
75	1.9	4.48	4.16	4.16	4.27 \pm 0.15	3.03	1.87
100	2	4.16	4.16	4.48	4.27 \pm 0.15	3.12	1.99
500	2.7	5.00	4.75	5.00	4.92 \pm 0.12	4.63	2.7
1000	3	8.09	5.00	5.52	6.2 \pm 1.35	6.51	3.0

Fuente: Meybis Pitti, 2020



Gráfica 2. Toxicidad aguda de artemia salina nauplios en exposición al extracto *C. brasiliense* después de 24 horas expresado en unidades *Probit*.

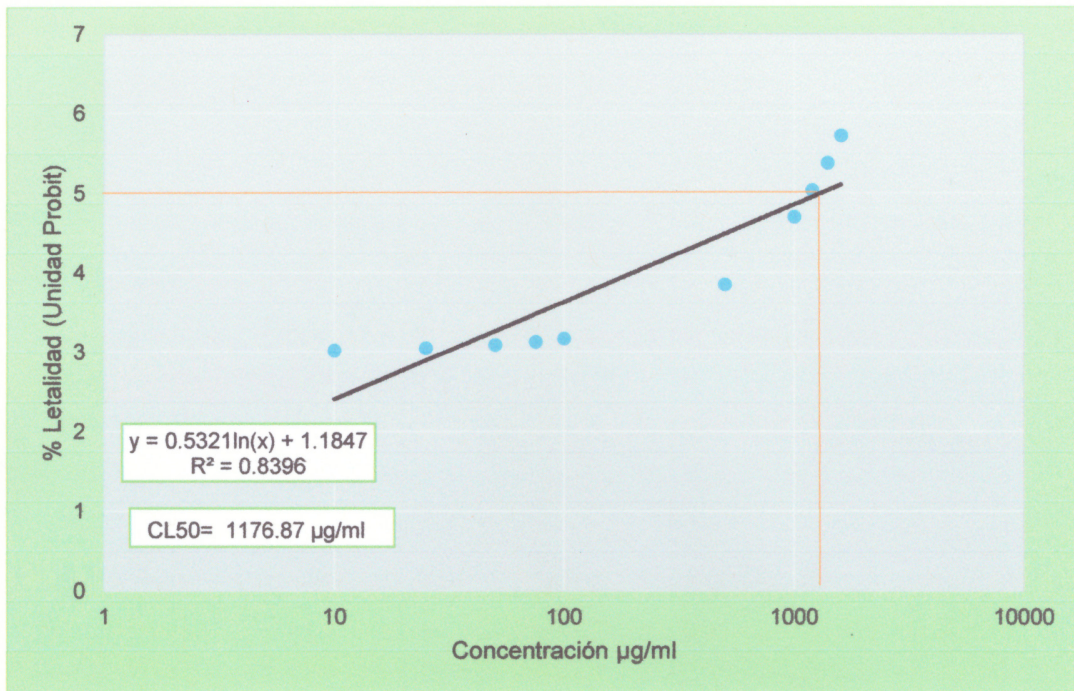
La concentración letal 50 obtenida en nuestro ensayo para el extracto *C. brasiliense* fue de 599.06 µg/ml. Se puede considerar una planta significativamente tóxica, muestra actividad citotóxica a concentraciones iguales o menores de 10 µg/ml, por lo que podríamos considerar que este extracto presenta una toxicidad intermedia. En los nauplios expuestos a este extracto se observó disminución del movimiento desde concentraciones de 50 µg/ml. Un estudio en el que se utilizó el ensayo de *Artemia salina* en un extracto metanólico de esta planta (Ibañez, 2007) se documentó una CL50 de 70.5 ppm (70.5 µg/ml). Este dato está en cerrada concordancia con el encontrado en el presente estudio, lo cual sustenta la alta actividad citotóxica del extracto de esta planta.

4.4.3 Toxicidad aguda en *Siparuna guianensis* evaluada mediante el ensayo de *Artemia Salina*.

Tabla 12. Porcentaje de letalidad (unidades *probit*) de *Artemia salina* después de 24 horas de exposición al extracto *S. guianensis*.

Concentración de <i>S. guianensis</i> $\mu\text{g/ml}$	Log Concentración <i>S. guianensis</i>	% de Letalidad en <i>Artemia Salina</i> (<i>probit</i>)			Promedio \pm Desviación Estándar	y Estimada	x Estimada
Control	0	0	0	0	0		
10	1	0	0	0	0	3.02	0.28
25	1.4	0	4.16	4.16	2.77 \pm 1.97	3.05	1.24
50	1.7	4.16	4.16	3.72	4.01 \pm 0.21	3.09	1.58
75	1.9	4.16	4.16	4.75	4.36 \pm 0.28	3.13	1.77
100	2	4.48	4.48	4.16	4.37 \pm 0.15	3.17	1.9
500	2.7	4.48	4.48	4.75	4.57 \pm 0.13	3.85	2.63
1000	3	4.75	4.16	4.48	4.46 \pm 0.24	4.7	2.94

Fuente: Meybis Pitti, 2020



Gráfica 3. Toxicidad aguda del extracto de *S. guianensis* en nauplios de *Artemia salina* nauplios después de exposición al durante 24 horas

La CL50 obtenida para esta planta fue de 1,176.87 µg/ml como puede observarse en la Gráfica 3.

Desde las concentraciones de 50 y 75 µg/ml los individuos mostraron poco movimiento, las concentraciones de 500 y 1000 µg/ml se observó casi nulo el movimiento de los individuos.

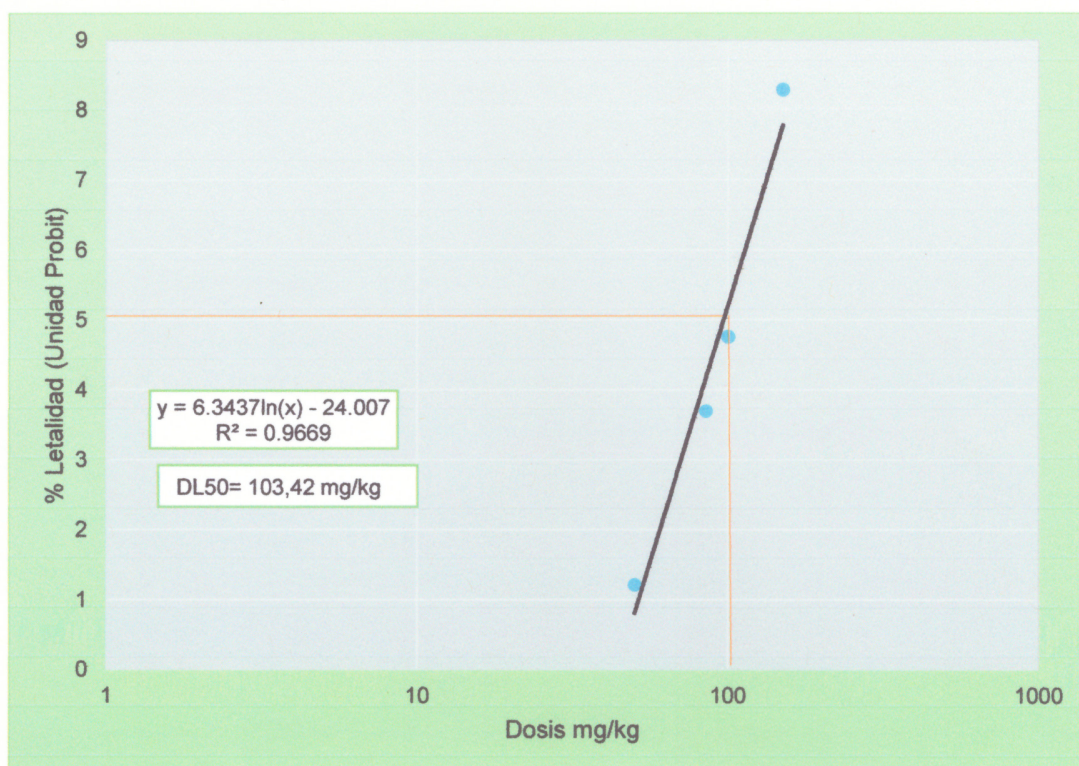
En el tamizaje fitoquímico se muestra una alta presencia de cumarinas y alcaloides, además de taninos que son metabolitos secundarios con propiedades tóxicas o citotóxicas en algunos casos. Sin embargo, de acuerdo con Meyer et al, (1982) la *S. guianensis*, no muestra toxicidad significativa. Debido a que no encontramos en la literatura revisada ninguna prueba toxicológica in vivo o in vitro, este es el primer dato de toxicidad que se presenta sobre la misma.

4.5 DETERMINACIÓN DE PATRÓN DE TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO C. BRASILENSE EN RATAS WISTAR

Tabla 13. Determinación de patrón de toxicidad aguda del extracto de *C. brasiliense* en Ratas Wistar adultas.

Dosis C. <i>brasiliense</i> mg/kg	Log de Dosis	N° de Individuos	N° de Muertes	% Mortalidad	Probit % de Muertes	y Estimada	x Estimada
Control	0	4	0	0	0		
25	1.4	4	0	0	0	-0.55	---
50	1.7	4	0	0	0	1.22	1.7
85	1.93	4	1	25	4.33	3.7	1.93
100	2	4	2	50	5.00	4.76	2.0
150	2.18	4	4	100	8.09	8.29	2.17

Fuente: Meybis Pitti, 2020



Gráfica 4. Toxicidad aguda en ratas winstar adultas tratadas con extracto de *Calophyllum brasiliense*.

Las ratas que fueron tratadas con dosis de 150 mg/kg mostraron rápidamente efectos secundarios y las ratas de este grupo murieron al tercer y cuarto día de tratamiento. Del grupo de dosis de 100 mg/kg dos fallecieron en el sexto y octavo día de tratamiento. Los individuos administrados con 85 mg/kg igualmente mostraron los efectos físicos observados en la figura 16 B, de este grupo solo hubo una muerte. En las dosis de 25 y 50 mg/kg, los individuos solo reflejaron erizamiento de piel, caída del pelo y disminución en el apetito; en estas dosis no hubo sangrado nasal y ocular. Ver tabla 13

El extracto de *C. brasiliense* presentó una gran variedad de metabolitos secundarios como antes se ha mencionado. Según los resultados sobre la toxicidad aguda (Tabla 13; Gráfica 4) y los signos macroscópicos que presentaron las ratas en este estudio (Tabla 14) y de acuerdo también con algunos datos de la bibliografía consultada las posibles causas de tan alta toxicidad, encontrada por nosotros

(DL50 de 103.42 mg/kg) puede estar relacionada con la alta o abundante presencia de cumarinas tipo mammea y de saponinas, que es reconocido que según varios autores tienen alta actividad citotóxica (García et al, 2014, Bruneton, 1999).

4.5.1 EFECTOS MACROSCÓPICOS DE SALUD DEL EXTRACTO *C. BRASILIENSE* EN EL ASPECTO CORPORAL DE RATAS WISTAR ADULTAS

Tabla 14. Signos macroscópicos observados en las ratas tratadas con el extracto *C. brasiliense*.

observados en ratas administradas con dosis altas del extracto de <i>C. brasiliense</i>
Pelo erizado.
Disminución en la ingesta de alimentos.
Perdida rápida de peso.
Caída del pelo.
Hemolisis (Sangrado en nariz y ojos)
Diarrea
Poco movimiento
Dolor intenso en el área de administración.



Figura 17. Comparación entre ratas en tratamiento y control.

A. Rata control en condiciones estándar. B. Rata tratada con 85 mg/kg del extracto *C. brasiliense*.

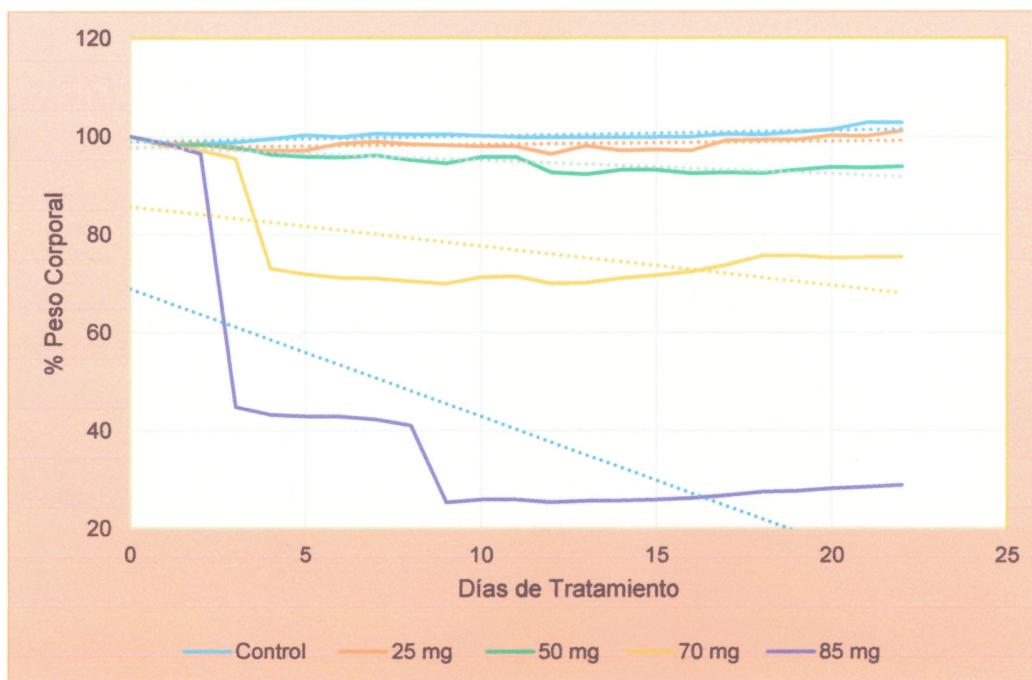
Fotografía: Meybis Pitti, 2020

En la figura 16 se observa la diferencia de la rata control y la que estuvo en tratamiento con dosis de 85 mg/kg). El primer síntoma observado fue el erizamiento del pelo, además en los primeros días presentaron pérdida de peso significativo que continuó en los siguientes días hasta su deceso.

Uno de los síntomas más característicos fue el sangrado en nariz y ojos. Este efecto podría estar relacionado con el alto contenido de saponinas que se documentó en el tamizaje fitoquímico del extracto de *C. brasiliense*. Las saponinas tienen una actividad biológica muy característica que es la actividad hemolítica. Los esteroides de saponinas se unen a la membrana eritrocitaria alterando la permeabilidad de dicha membrana, lo que puede llevar a la liberación de hemoglobina y hemorragias (Bruneton, 1999). También se encontraron flavonoides abundantes. Se ha documentado que la quercetina (un flavonoide abundante en algunas plantas) puede inhibir la agregación plaquetaria y producir un aumento en el riesgo de sangrado (Hubbard Et al, 2004; Janssen, 1998). Aunque para este

extracto no se determinó el tipo de particular de flavonoides, la abundancia de estos metabolitos, también podrían estar asociados con los efectos observados.

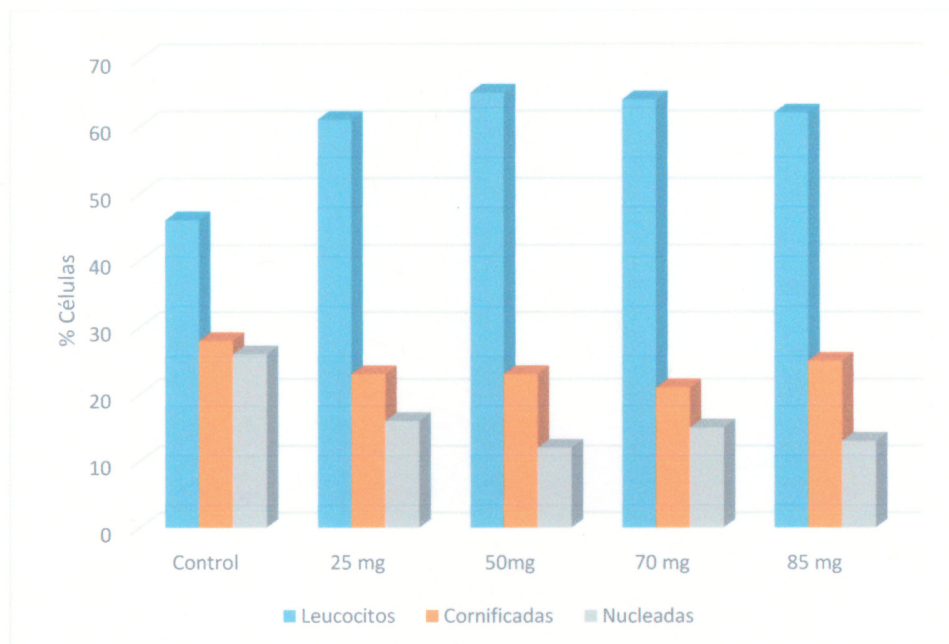
4.5.2 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DEL EXTRACTO *CALOPHYLLUM BRASILIENSE* EN EL PESO CORPORAL.



Gráfica 5. Efecto del extracto hidroalcohólico *Calophyllum brasiliense* sobre el peso corporal.

La gráfica 5 muestra el efecto del tratamiento de *C. brasiliense* en el peso corporal de las ratas. Las dosis de 25 y 50 mg/kg no muestran una diferencia significativa en el peso promedio de los animales con respecto al primer día de tratamiento (100%) en comparación con los individuos control, sin embargo, en las dosis 70 y 85 mg/kg se observó disminución significativa del peso corporal con respecto al peso inicial. De estas dosis altas se observó una disminución progresiva del peso desde 2 g hasta 12 g por día hasta llegar a la muerte del individuo, la cual para la mayoría de los individuos ocurrió al quinto día de tratamiento.

4.5.3 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DEL EXTRACTO DE *C. BRASILIENSE* EN LA CITOLOGÍA VAGINAL DE RATAS ADULTAS NO OVARIOCTOMIZADAS.



Gráfica 6. Efecto de la administración intraperitoneal del Extracto de *Calophyllum brasiliense* sobre la citología vaginal (% de células en el frotis) de Ratas Wistar adultas después de 21 días de tratamiento.

En la gráfica 6 se puede observar los cambios en la citología vaginal desde la dosis de 25 *mg/kg* de peso. Se puede observar un aumento aproximado de 10% en el porcentaje de leucocitos en comparación del control. Se observa disminución en el porcentaje de células cornificadas y en células nucleadas en comparación con el control.

El grupo al cual se le administró 50 *mg/kg* de peso del extracto fue el que presentó mayor efecto en comparación con el grupo control. (Aumento de casi el 20% en el porcentaje de leucocitos y una gran disminución en el porcentaje de células nucleadas, respecto al grupo control).

En el grupo de dosis de 70 y 85 *mg/kg* de peso no presentan diferencia significativa entre ellos. Aumenta los niveles de leucocitos en un 15% y disminuye los niveles de células nucleadas aproximadamente 18% en comparación del grupo control.

Es notorio que el % de células cornificadas en todos los grupos no mostraron cambios notables, sin embargo, el % de células nucleadas si disminuyó en forma significativa.

De acuerdo con lo documentado en la literatura, respecto a las fases del ciclo estral de la rata, los leucocitos se mantienen en mayor proporción durante la fase de Diestro, las células nucleadas se encuentran en mayor proporción en la fase proestro y las células cornificadas en la fase de Estro. En la gráfica 6 se observa que todas las dosis administradas muestran un aumento de leucocitos en comparación con los individuos de control por lo que podemos concluir que el extracto administrado los prolonga en forma significativa la fase de diestro.

4.6 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO *C. BRASILIENSE* EN EL CICLO ESTRAL DE RATAS ADULTAS.

La administración del extracto de *C. brasiliense* fue administrada en tres etapas diferentes del ciclo estral de la rata. En cada etapa se observó un comportamiento diferente en el ciclo estral del individuo.

4.6.1 Individuos administrados en fase diestro con el vehículo (solución salina)

control

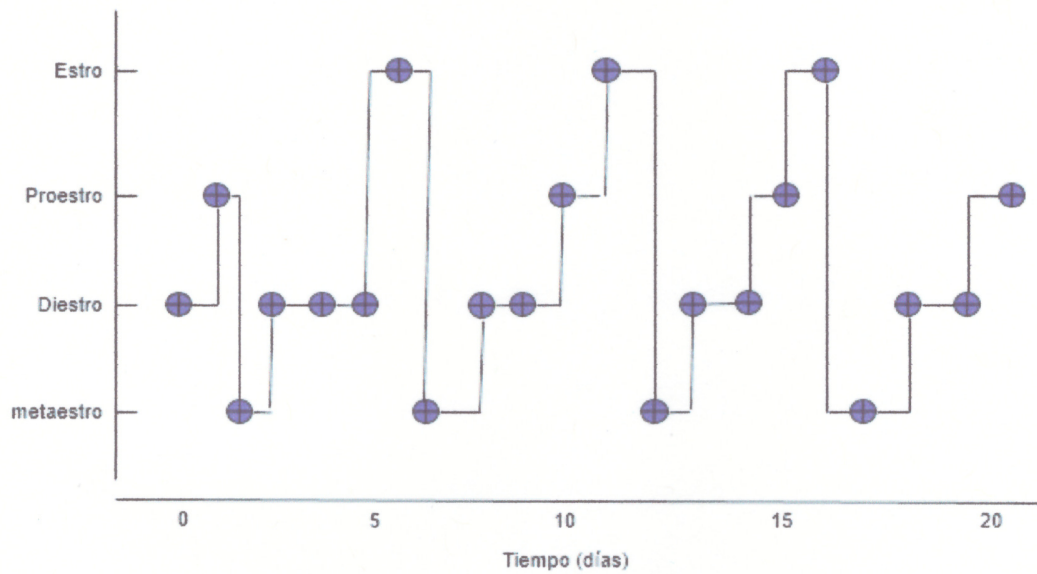


Figura 18. Ciclo estral de ratas adultas. Ciclo de 4 a 5 días.

Las ratas control tratadas con el vehículo (solución salina) permanecieron con el ciclo estral normal. Este ciclo estral puede durar 4 o 5 días. Los individuos mostraron un ciclo normal desde el día 5 desde donde se logra identificar todas las fases del ciclo estral.

4.6.2 Individuos administrados en fase metaestro con 25 mg/kg del extracto.

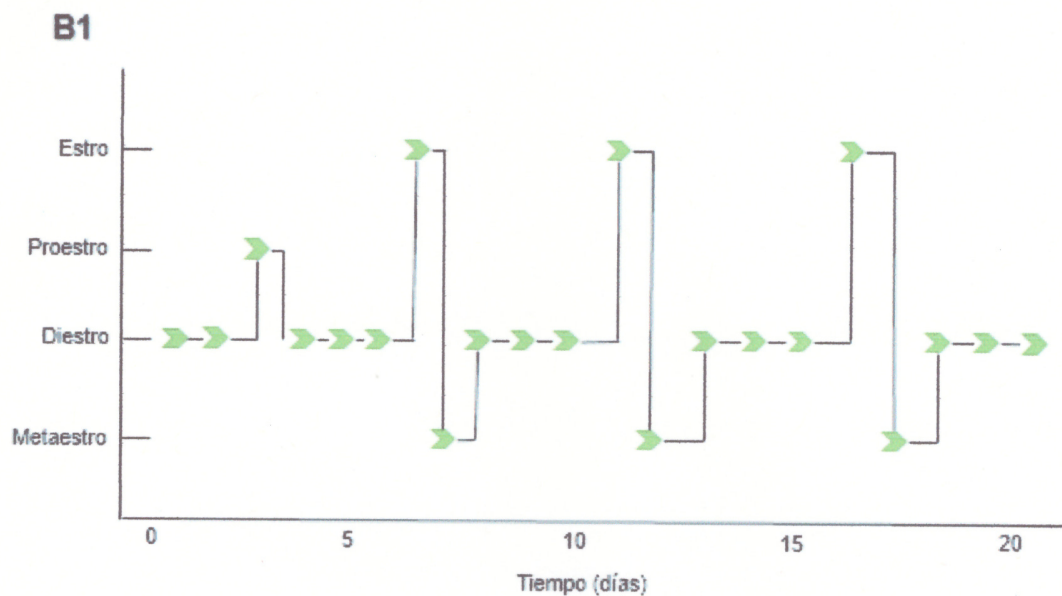


Figura 19. Efecto de la administración intraperitoneal de 25 mg/kg del extracto *C. brasiliense* en 2 fase diestro (B1).

Los individuos administrados con 25 mg/kg del extracto *C. Brasiliense* mostraron ciclicidad en su ciclo estral, en donde se llegan a la fase estro pasando por un día en metaestro y tres días en fase diestro. Por lo que puede observarse un acortamiento de las fases proestro y estro. La fase Proestro solo se logra observar una vez al inicio del tratamiento. Ver figura 19

4.6.3 Individuos administrados en fase diestro con 50 mg/kg del extracto.

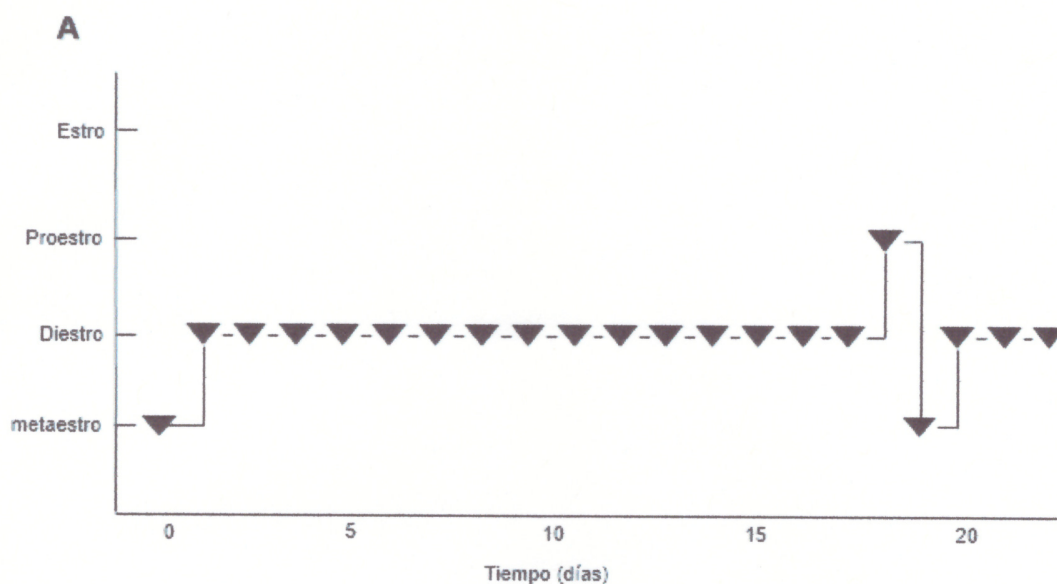


Figura 20. Efecto de la administración intraperitoneal de 50 mg/kg del extracto *C. brasiliense* en fase metaastro.

Los individuos al ser administrados con 50 mg/kg en la fase Metaastro pasaron a la fase de Diestro franco en el cual permanecieron diestro por más de 15 días. Posterior pasaron a proestro y luego a metaastro para continuar en diestro. No se observó la fase de Estro en estos individuos.

4.6.4 Individuos administrados en fase diestro con 70 mg/kg del extracto.

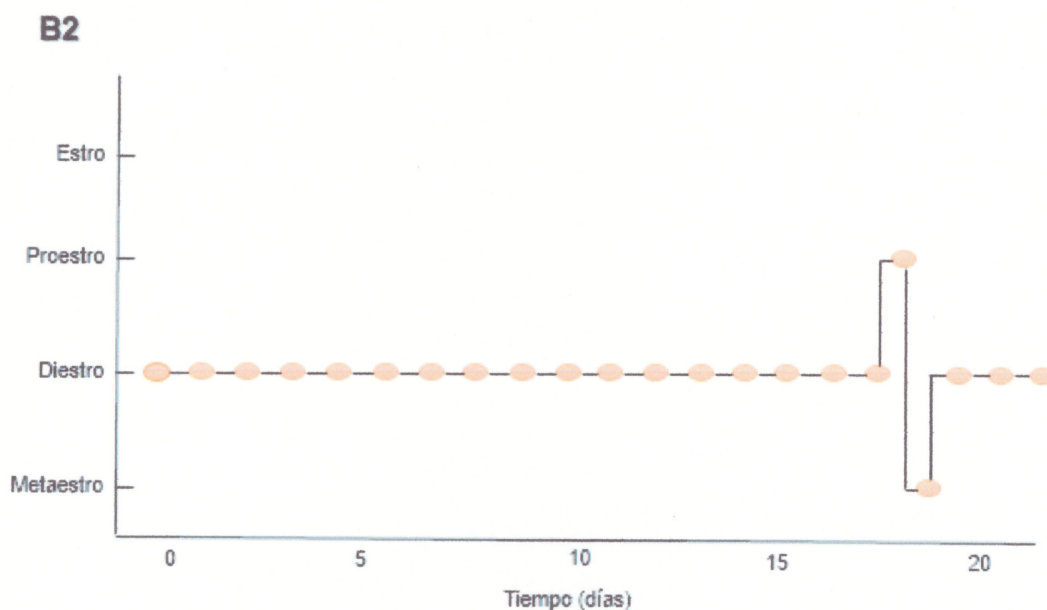


Figura 21. Efecto de la administración intraperitoneal de 70 mg/kg del extracto *C. brasiliense* en fase diestro (B2).

En los individuos administrados con 70 mg/kg en la fase diestro mostraron cambio en el ciclo estral, estos se mantuvieron en diestro más de 15 días, posterior pasaron a proestro y metaestro para volver a diestro.

Estos individuos al igual que los individuos administrados con 50 mg/kg en fase metaestro (figura 18) mostraron un diestro persistente de más de 15 días lo cual semeja una condición de pseudo-embarazo. Un pseudo-embarazo puede ser inducida por estímulos que son similares a los estímulos coitales de la copulación del macho; esto se puede identificar a través de la examinación del exudado vaginal del individuo durante 13 o 14 días en donde se mantienen en diestro (Terkel, 1988). Sin embargo, en este estudio se observa que el diestro persistente vuelve a instaurarse después de que se sale dos días del diestro, pero no se observa en ningún caso la fase de estro.

4.6.5 Individuos administrados en fase diestro con 85 mg/kg del extracto.

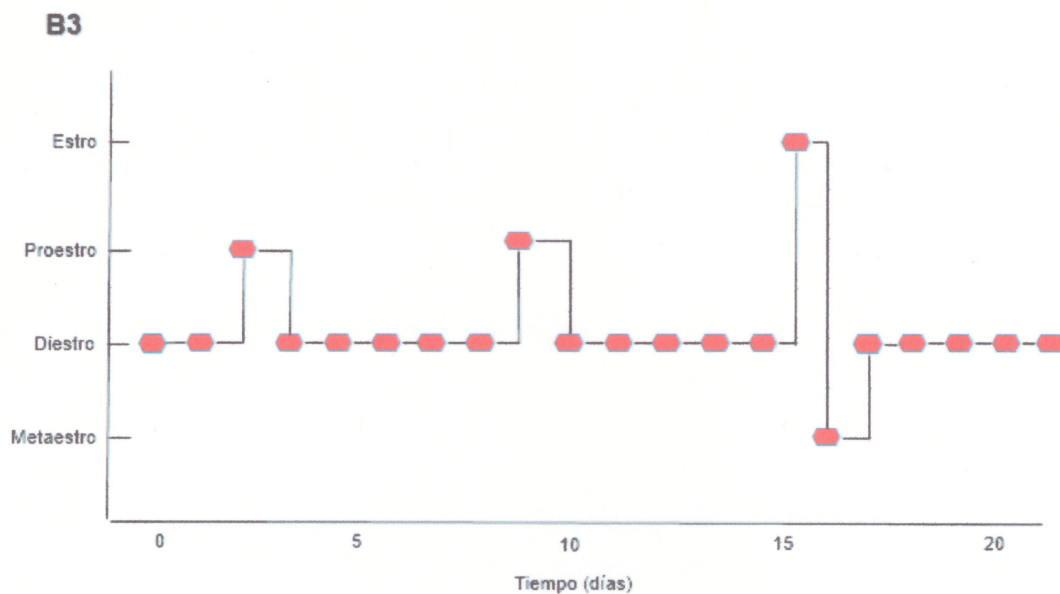


Figura 22. Efecto de la administración intraperitoneal de 85 mg/kg del extracto *C. brasiliense* en fase diestro (B3).

En los individuos administrados con dosis de 85 mg/kg en fase diestro se observó alargamiento en el ciclo estral de seis y siete días en donde solo se observa un día en fase proestro o fase estro, esto se debe a el acortamiento de estas fases.

Todos estos individuos administrados en la fase diestro, en las distintas dosis, mostraron tendencia al estado de diestro persistente (a excepción de los individuos administrados con dosis de 25 mg/kg), además de un acortamiento de las fases proestro, estro y metaestro; en donde estas fases pasaban en conjunto aproximadamente 24 horas.

Cabe resaltar que el tiempo de tratamiento en el ensayo es de 21 días en donde se debían observar cuatro ciclos estrales completos en los individuos sin tratamiento. Por lo cual solamente los individuos administrados con 25 mg/kg del extracto en la fase diestro cumplieron con los 4 ciclos completos y los demás sujetos mostraron irregularidades notorias en el ciclo normal.

CAPÍTULO V CONCLUSIONES

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El método de determinación de la toxicidad aguda (CL50) de extractos de plantas con posibles efectos terapéuticos, en nauplios de *Artemia salina* es un método reproducible, de relativamente fácil procedimiento y bajo costo, Permite conocer la toxicidad de la mezcla de los principios activos contenidas en los extractos. Bajo la premisa de que las plantas tienen actividad terapéutica o toxicológica por la coexistencia de diferentes metabolitos este método es valioso, aunque no discrimina sobre los efectos de un componente particular, pero sirve como una guía inicial a seguir ya que las actividades observadas en conjunto pueden ser el resultado de acciones agonistas, antagonistas, sinérgicas o de potenciación presentadas por la totalidad de los metabolitos, más que por un metabolito en específico. La realización de otras farmacológicas y toxicológicas pruebas basándose en una adecuada marcha fitoquímica ofrece un panorama más completo sobre efectividad y seguridad en la evaluación preliminar de plantas con posibles efectos terapéuticos.
- Según los resultados obtenidos en este estudio mediante el bioensayo de *Artemia salina* los extractos de (canchalagua) *C. erythraea* y (Pasma café) *S. guianensis* no presentan toxicidad significativa ya que los valores de CL50 están muy por encima de los valores referenciales para este tipo de estudios Mientras que el extracto de (Arbol María) *C. brasiliense* mostró significativamente toxicidad (CL50 <1000 µg/ml).
- El extracto de *C. brasiliense* posee metabolitos secundarios con actividad en el sistema endocrino alterando las funciones del sistema reproductor. Dicha actividad en el sistema endocrino se presentó como actividad anti-estrogénica, más en este estudio no se puede determinar el mecanismo.

- La concentración letal 50 en mg/kg de peso, del extracto de *C. brasiliense* tanto en el método de *Artemia salina* como en el de Ratas Wistar son muy bajas por lo que la toxicidad de esta planta es alta. Esta alta citotoxicidad permite recomendar que los extractos de esta planta deben ser considerados en cualquiera de los usos tradicionales que se le atribuyen a esta planta.
- A nivel reproductivo el extracto de *C. brasiliense* en dosis altas en la rata altera el ciclo estral produciendo un alargamiento en la etapa de diestro y ausencia de ovulación.
- La ausencia de ovulación y la aciclicidad en el ciclo estral pueden estar relacionados con los efectos antifertilizantes atribuidos al *C. brasiliense*. Aunque los mecanismos de esta aciclicidad no pueden extrapolarse de esta investigación, la presencia de flavonoides determinada en la marcha fitoquímica podría estar relacionada con principios con actividad antagonista a nivel del receptor estrogénico o agonistas a nivel de receptores de progesterona.
- El uso empírico de plantas para usos medicinales ha ayudado a encontrar muchas moléculas con actividad terapéutica. Sin embargo, muchas plantas de las que se utilizan de esta manera poseen alta toxicidad por lo que es recomendable la realización de estudios que determinen tanto eficacia como seguridad con el fin de disminuir riesgos en la salud, muy particularmente en zonas de poco acceso a la medicina institucional.
- El presente estudio de la planta *C. brasiliense*, abre una línea para futuros estudios sobre los efectos reproductivos de esta planta, los cuales han sido poco estudiados. Varios de los principios activos de esta planta han sido aislados y se están siguiendo ya fases preclínicas y clínicas avanzadas en otros países, por lo que consideramos de alta relevancia los efectos

encontrados en este trabajo, tanto a nivel de los efectos anti-fertilidad como de la toxicidad. Esto puede ser de valor en la búsqueda de agentes anovulatorios, base para el aislamiento de los principios relacionados con los efectos, y mediante adecuado modelado o hemisíntesis considerar los efectos beneficiosos reduciendo la toxicidad.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1

Encuesta sobre uso de plantas medicinales a nivel reproductivo

La encuesta se realizó en el distrito de Dolega en las comunidades de Las Tinajas, El Flor y Las Cañas. La cantidad de personas encuestadas en las comunidades mencionadas fue de 70 personas en total.

En el siguiente cuadro se muestra las preguntas realizadas y los resultados obtenidos en promedio:

Preguntas	Respuestas
¿Utiliza plantas medicinales?	90% Si 10% No
Para qué enfermedades utiliza plantas medicinales?	Gastrointestinales Dolor y fiebre Trastornos menstruales
¿Qué plantas conoce para tratar trastornos del sistema reproductor Femenino?	Canchalagua Pasma Café Hoja de murciélago Árbol María

ANEXO 2

METODOLOGIA PARA LA PREPARACIÓN DE REACTIVOS USADOS EN EL TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Reactivo	Preparación
Draguendorff	Se prepara mezclando 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico al 30%, con una solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua. Se deja reposar 24 horas, se decanta y se afora a 100 ml.
Mayer	Se prepara disolviendo 1.3 g de bicloruro de mercurio en 60 ml de agua y 5 g de yoduro de potasio y se afora a 100 ml.
Wagner	En un matraz volumétrico de 100 ml, disolver 1.27g de yodo (resublimado) y 2 gotas de yoduro de potasio en 20 ml de agua. Aforar la solución con agua destilada.
FeCl ₃ al 5%	Disolver 1.25 g de cloruro férrico en 25 ml de agua y aforar a 50 ml con alcohol metílico.
HCl al 10%	En un matraz volumétrico de 100 ml se agregan 8.3 ml de HCl concentrado, luego se afora con agua destilada hasta los 100 ml.
Acetato de Plomo 10%	Se pesan 10 g de acetato de plomo y se disuelven en 100 ml de agua destilada.
Baljet	Se mezcla 1g de ácido pícrico en etanol al 95% y 10g de NaOH en 100 ml de agua.
NaOH al 10%	Se pesan 10 g de NaOH y se disuelven en 100 ml de agua destilada.

ANEXO 3.

METODOLOGIA DE LAS PRUEBAS REALIZADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Prueba	Reacción
Draguendorff	Se detecta presencia de alcaloides por la formación de precipitado naranja rojizo cuando se adiciona este reactivo a una solución ácida de alcaloides.
Mayer	Se detecta presencia de alcaloides cuando se forma un precipitado blanco o color crema soluble en ácido acético y etanol.
Wagner	Se detecta presencia de alcaloides cuando se forma un precipitado de color marrón.
Shinoda	Se basa en la oxidación de magnesio e indica un núcleo de benzopirona, cuando se presenta cambio de color a rojo a magenta.
Salkowski	Si presenta una coloración amarilla o roja hay presencia de esteroides.
Liebermann-Bouchard	La prueba es positiva para esteroides si aparecen cambios de colores azul, verde naranja o rojo.
Acetato de plomo al 10%	La formación de precipitado blanco es positiva de presencia de taninos.
Cloruro férrico al 5%	La formación de un precipitado azul verdoso indica la presencia de taninos.
Reacción Sal-Gelatina	La formación de un precipitado es indicativo de presencia de taninos
Baljet	Es una reacción de coloración, la prueba es positiva si la coloración es color rojo vino.
Prueba de Legal	Es una reacción de coloración. Es positivo si presenta color de rosado intenso a rojo sangre.
Prueba de Espuma	La presencia de saponinas se muestra cuando al ser agitada la muestra de extracto con agua, la formación de espuma permanece por más 15 minutos en donde la altura de espuma debe ser mayor de 5 mm. Esto se debe a las propiedades físicas que poseen las saponinas.

BIBLIOGRAFIA

Aguilar S., Miranda M., Quintana A. 2017. La mujer, el ciclo menstrual y la actividad física. Facultad de cultura física y deporte. Universidad de Camagüey, Cuba. **ISSN: 1025-0255.**

Antonio T., Waller G., Mussinan C. 1976. Industrias Químicas. Composición del aceite esencial de las hojas de *Siparuna guianensis* (Momiaceae). **16, 1187-1188**

Arencibia-Carballo G., Tizol-Correa R., Rodríguez R. 2010. Toxicidad de nauplios de *Artemia franciscana* a dos piretroides de uso comercial. Volumen 27. Pag. 47-53 **ISSN 0138-8452**

Asturnatura.com "Centaurium erythraea Rafn". Asturnatura.com [en línea] Núm. 148, 6 de octubre del 2007. (Consultado el 1 de nov. de 18) **ISSN 1887-5068.** <https://www.asturnatura.com/especie7centaurium-erythraea.html>

Braz-Filho R., Gabriel S., Gomes C., Gottlieb O., Bichara M., Maia J. 1976. Oxoaporfine alkaloids from *Fusea longifolia* and *Siparuna guianensis*. *Phytochemistry*. Volumen 15. **Pp: 1187-8**

Bruneton J. 1999. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. 2da. Ed. Zaragoza. Ed. Acribia

Castillo G., Zavala D., Carrillo M. 2017. Análisis fitoquímico: una herramienta para develar el potencial biológico y farmacológico de las plantas. *Revista académica de investigación Tlatemoani*. Editorial: Eumed.net. Volumen 8, Pag. 71-86 **ISSN: 19899300.**

Correia M. 2014. Cumarinas: versatilidad estructural y aplicaciones en Química Farmacéutica. Universidad De Santiago De Compostela. Facultad de Farmacia. Minerva Repositorio Institucional de USC.

<http://hdl.handle.net/710347/9787>

Curosiando.com. "¿Qué son los disruptores endocrinos?" Curosiando.com [en línea]

<https://curosiando.com/disruptores-endocrinos/amp>

Freeman M., E. Knobil and J.D. Neill, Raven Press. 1994. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. Physiology of reproduction secondary edition. **46: 613-658**

Galassi P. & Gullace F. Reproducción en animales de laboratorio. Facultad de ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires.

García J., Reyes R., Huerta M., Castillo J., Santillán S., Vásquez B., Mendoza J. 2014. El árbol tropical *Calophyllum J.brasiliense*: Revista botánica, química y farmacológica. **ISSN: 0121-4004.**

Goodman & Gilman. 2019. Capítulo 42: Introducción a la endocrinología: eje hipotálamo-hipófisis. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 13^{ra} edición. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A.

Goodman & Gilman. 2019. Capítulo 44: estrógenos, progestinas y tracto reproductor femenino. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 13^{ra} edición. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A.

Gracia S. 2010. Efecto Estrogénico del extracto Hidroalcohólico de alfalfa (*Medicago Sativa*) en Ratas Albinas Ovariectomizadas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Grasso P., Rozhavskaia M., & Reichert LE. 1998. In vivo effects human follicle-stimulating hormone related synthetic peptide hFSH-b-90-95 on the mouse estrous cycle. *Biol Reprod*, **58**: 821-25

Guillen P. & Sarmiento G. 2011. Validación de las metodías aplicadas a los procesos de selección, lavado, secado y almacenamiento para plantas medicinales a través de aplicación de técnicas oficiales basadas en la farmacopea de la organización mundial de la salud. Universidad de Cuenca.

Gutiérrez A. 1984. Métodos Estadísticos Para Determinar La Dosis Mediana Efectiva En Ensayos Biológicos. Pag. 437-449. Repositorio AGROSAVIA.
<http://hdl.handle.net/20.500.1234/23056>

Hall J. E. Harrison 2016. Capítulo 412: trastornos del aparato reproductor femenino. Principios de la medicina interna 19 ed. [Internet]
<https://harrisonmedicina.mhmedical.com/cont.aspx?bookId=1717§ionId=114939076>

Hernández J. 2009. Exposición a Fitoestrógenos y su relación con la actividad física y dieta mediterránea. Universidad de Granada. ISBN: 978-84-692-5075-4

Hubbard GP., Wolfram S., Lovegrove JA., et al. 2004. Ingestion on quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans. **2(12): 2138-2145.**

Ibañez L. 2007. Efecto antitumoral, anti VIH y elucidación estructural de las hojas y corteza de *Calophyllum brasiliense* de Satipo y Pucallpa. Revista ACAD Perú Salud.

Jain P. & Joshi H. 2012. Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. *Journal of applied pharmaceutical science*. **02(06). 236-240.**

Jassen K., Mensink RP., Cox FJ., et al. 1998. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and dietary supplement study. *Am J Clin Nutr.* **67(2): 255-262**

Lavens P., Sorgeloos P., 2000. The history, present status and prospect of the availability of Artemia Cyst for aquaculture. *Aquaculture* **181, 397-403.**

Mahecha C. 2010. Actividad antioxidante de aceites esenciales extraídos de hojas y frutos de *Siparuna sessiliflora*. Universidad Javeriana. Bogotá.

Makela S.I., Pylkkanen L.H., Santti R.S.S., Adlercreutz H. 1995. Dietary soybean may be antiestrogenic in male mice. *J. Nutr.* **125, 437.**

Martin N. publicado el 14 de octubre del 2015. Artemia salina (parte I). Planeta Neli. Recuperado de: <http://www.planeta-neli.es/index.php/2015/10/14//artemia-salina/>

Messina M., 1999. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects, *Am. J. Clin. Nutr.* **70, 439S**

Meyer B. N. et al. 1982. "Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents", *journal of medicinal plant research*, **(45): 31-34.**

Muséum national d'Histoire naturelle [Ed.] 2003-2018. National Inventory of Natural Heritage. (consultado el 1 de noviembre de 2018) Sitio web: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/735134/tab/taxo?lg=en

Natural Herbs. 2015. Common Centaury (*Centaureum erythraea*). [consultado el 1 de noviembre de 2018] <http://www.naturalherbs.ro/herbs/gyogynovenyek/common-centaury-centaurium-erythraea/>

Olea N, Olea-Serrano F. 1996. Estrogens and the environment. *Cancer Prevention J.* **5: 1-6.**

Organización Mundial de la Salud. Estrategias de la OMS Sobre Medicina Tradicional 2014-2023. ISBN 978 92 4 350609 8. www.who.int

Outeriño V. 2015. GLP-1 Regula la función del Sistema Reprodutor de la Rata Hembra. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Universidad de Vigo.

Palacios M. 2008 Introducción a la farmacognosia (30 de noviembre del 2008). Farmacognosia [Blog]. Recuperado de: <http://farmacognosia-farmaciauadech.blogspot.com/2008/11/farmacognosia.html>

Patiño L., Ph.D. 2016. Guía para la realización de pruebas de Tamizaje Fitoquímico. Versión 1.0. Universidad Autónoma de Chiriquí.

Pino N. Martínez L. y Stashenko E. 2008. Actividad antibacteriana de *S. cónica* y *S. guianensis* especies de la familia Monimiaceae. Revista de la Facultad de Salud. Universidad Industrial de Santander.

Pino O. & Lazo F. 2010. Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. Revista de protección vegetal v.25 n.1 La Habana. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522010000100008

Portal Educativo. 2009. El ciclo menstrual. www.portaleducativo.net revisado el 25 de diciembre del 2019. <https://www.portaleducativo.net/septimo-basico/783/El-ciclo-menstrual>

Ramos G., Frutos P., Giráldez F. J., Mantecón A. R. 1998. Los Compuestos Secundarios De Las Plantas En La Nutrición De Los Herbívoros. Estación Agrícola Experimental. Arch Zootec. **47:597-620**

Renner, Susanne S. & Hausner, Gerline. 2005. Monographs Details: Siparuna guianensis Aubl. World Flora Online. Siparunaceae. Fl. Neotrop. Monogr. Recuperado de: <http://sweetgum.nybg.org/science/world-flora/detailes.php?irn=19210>

Reyes F., Reyes R., Salgado H., Cornejo H. 2016. Eclosión de los huevos de artemia (*artemia franciscana* Kellogg) a nivel de laboratorio. Universidad nacional agraria, Managua. Revista científica "LA CALERA. Recuperado de: <http://www.lamjol.info/index.php/CALERA/article/view/6006/5706>

Rodríguez A., Zarranz J., Digón A., Galdós L. 2007. Estudios genealógicos del insomnio familiar letal en el país vasco. Departamento de zoología y biología celular. Facultad de farmacia, universidad del país vasco. *Antropo*, **15**, 41-47

Rubianes E. 2000. Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños rumiantes y su aplicación para el manejo reproductivo. *Actas de Fisiología*. **6**: 93-103.

Santizo I. 2004. Identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera*. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Sepúlveda G., Porta H., Rocha M. 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Volumen 21. Pp. 355-363

Souza AM. 2006. Estructura genética de populações naturais de *Calophyllum brasilienses* Cam. [doctoral Thesis]. Universidad federal de Lavras 145p. Minas Gerais, Brasil.

Terkel, J. 1988. Neuroendocrine processes in the establishment of pregnancy and pseudopregnancy in rats. *Psychoneuroendocrinology*. **13**: 5-28.

Torres, Nilka L.; Martínez, José L.; Laurido, Claudio; Zapata, Alvin. 2016. Plantas medicinales de Panamá 1: Etnobotánica de la Reserva Forestal el Montuoso. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad de Santiago de Chile Santiago, Chile. **ISSN: 0717-7917**

Tresguerres JFA. 2010. Fisiología del eje hipotálamo-hipófisis-ovárico. Fisiología Humana. 4ª edición, McGraw-Hill Interamericana de España. **83: 1042-10-57**

Trópicos.org. Missouri Botanical Garden. *Calophyllum brasiliense* Cambess (internet). Saint Louis, Missouri, U.S. [1 de noviembre de 2018] <http://www.tropicos.org/name/7800054>

Valenzuela A., Ronco A. 2004. Fitoesteroides y fitoestanoles: aliados para la protección de la salud cardiovascular. Revista chilena de nutrición. **ISSN 0717-7518**

Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgelos P. 1980. Research on the development of a short-term standard toxicity test with *Artemia*. The brine shrimp *Artemia*. In Ecology. Culturing. Use in Aquaculture.

Vidari G. & Vitafinzi P., 2010. La Gentianaceae: botánica, fitoquímica y actividad biológica. LA GRANJA. Revista de ciencias de la vida. Universidad Politécnica Salesiana Ecuador. **ISSN: 1390-37.99**

Vogel A. 2018. *Centaurium erythraea* Ranf (centaura menor). Enciclopedia de las plantas A. Vogel-since 1923. Recuperado de: <http://www.avogel.es/enciclopedia-de-plantas/centaurium.php>

White RE. 2002. Estrogen and vascular function. Vascular Pharmacology. El Servier Volumen 38. Pag. 73-80 **ISSN 1537-1891**

Zhang XF. 1999. Xantone glycosides in gentiaceae of Qinghai-Tibet plateau. Studies in Plant Science. In Advances in Plant glycosides, Chemistry and Biology, Proceedings of the international Symposium in Plant Glycosides.