

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
PROGRAMA DE ESTUDIO DE MEDICINA HUMANA



TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO

**“EVALUACIÓN DE TOXICIDAD DE EXTRACTO ETANÓLICO
DE *Passiflora tripartita* SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE
Artemia franciscana”**

Área de investigación:

Biomedicina molecular y salud
comunitaria

Autor:

Br. Castañeda Marín, Elio Alvaro

Jurado Evaluador:

Presidente: Cáceres Andonaire, Elena Adela

Secretario: Rubio Guevara, Susana del Rocío

Vocal: Altamirano Sarmiento, Dan Orlando

Asesor:

Leiva Becerra, Elvira del Carmen

Código Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-1224-6342>

TRUJILLO-PERU

2023

Fecha de sustentación: 2023/01/19

DEDICATORIA

A Dios en primer lugar por ser mi fortaleza y por la bendición de permitirme seguir en este mundo cumpliendo objetivos de acuerdo a su voluntad.

A mis padres que me motivaron e inspiraron a seguir luchando día a día en la realización de mi tesis.

A mi familia que amo y respeto.

A mi primo Gabriel que partió por el COVID 19 y que siempre estará presente en el corazón familiar.

A mis profesores que en la universidad me dieron ese impulso de seguir el camino científico y académico.

A mis amigos y a mi querida SOCIEM UPAO por promover en mí el interés por la investigación científica en ciencias básicas y clínicas.

AGRADECIMIENTO

A Dios por concederme la vida y permitir seguir disfrutándola haciendo lo que me gusta.

A mis padres que fueron un motor importante en seguir luchando contra las adversidades y poder cumplir metas.

A mi asesora Elvira del Carmen Leiva Becerra que me apoyó en la elaboración y mejora del proyecto.

Al Laboratorio GENERBIN de mi alma mater por ser un lugar importante de generación de evidencia para mi tesis, conformado por un grupo de personas prestas a apoyar siempre.

Al Laboratorio de Investigación en Fisiología y Fisiopatología del Metabolismo de los Alimentos en la Ruta de la Investigación Nutricional de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, por permitirme utilizar sus instrumentos para la realización del presente trabajo.

ÍNDICE

| | |
|----------------------------|----|
| DEDICATORIA | 3 |
| AGRADECIMIENTO | 4 |
| RESUMEN | 6 |
| ABSTRACT | 7 |
| INTRODUCCIÓN | 8 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 13 |
| HIPÓTESIS | 13 |
| OBJETIVOS | 13 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 14 |
| RESULTADOS | 23 |
| DISCUSIÓN | 27 |
| LIMITACIONES | 29 |
| CONCLUSIONES | 29 |
| RECOMENDACIONES | 30 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 31 |
| ANEXOS | 35 |

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto tóxico del extracto etanólico de *Passiflora tripartita* sobre la supervivencia de *Artemia franciscana*.

Material y métodos: Se realizó un estudio experimental, básico. Para la marcha fitoquímica del extracto seco de las hojas de *Passiflora tripartita* se utilizó el Método de Olga Lock. Para el ensayo, se preparó tres grupos donde se colocó *Artemia franciscana* en su estadio de nauplio: Control negativo con agua de mar artificial, control positivo con dicromato de potasio y el grupo experimental preparado con 6 series de concentraciones de 5000, 1250, 312.5, 78.1, 19.5 y 4.88 $\mu\text{g/ml}$ de extracto etanólico, estableciéndose cuatro repeticiones para cada serie: T1, T2, T3, T4. A cada tubo de las repeticiones se les agregó 20 nauplios a las 24 horas de eclosionados, el muestreo fue de forma no probabilística. Se realizó la evaluación de supervivencia de los nauplios de *Artemia franciscana* con ayuda de microscopio óptico y micropipeta. Se comparó con la tabla de toxicidad del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología (CYTED).

Resultados: Según el análisis estadístico se obtuvo una mortalidad de 25 % en T1 y T3 con una dosis de 5000 $\mu\text{g/ml}$, siendo el porcentaje más alto de mortalidad respecto a T2 y T4 donde se obtuvo 20% y 15% respectivamente con la misma dosis. En T2 que corresponde a 4.88 $\mu\text{g/ml}$ se encontró un porcentaje de mortalidad de 0%, siendo la más baja dentro de las repeticiones realizadas.

Conclusiones: El extracto etanólico es ligeramente inocuo o no tóxico según la categorización CYTED.

Palabras clave: artemia, toxicidad, supervivencia, ansiedad.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the toxic effect of the ethanolic extract of *Passiflora tripartita* on the survival of *Artemia franciscana*.

Material and methods: An experimental, basic study was carried out. For the phytochemical analysis of the dry extract of *Passiflora tripartita* leaves, the Olga Lock Method was used. For the test, three groups were prepared where *Artemia franciscana* was placed in its nauplius stage: Negative control with artificial seawater, positive control with potassium dichromate and the experimental group prepared with 6 concentrations of 5000, 1250, 312.5, 78.1, 19.5 and 4.88 ug/ml of ethanolic extract, four repetitions were established for the latter: T1, T2, T3, T4. Twenty nauplii were added to each tube of the repetitions 24 hours after hatching, the sampling was non-probabilistic. The survival evaluation of the nauplii of *Artemia franciscana* was carried out with the help of an optical microscope. It was compared with the toxicity table of the Ibero-American Science and Technology Program (CYTED).

Results: According to the statistical analysis, a mortality of 25% was obtained in T1 and T3 with a dose of 5000 ug/ml, being the highest percentage of mortality with respect to T2 and T4 where 20% and 15% were obtained respectively with the same dose. In T2, which corresponds to 4.88 ug/ml, a mortality rate of 0% was found, being the lowest among the repetitions performed.

Conclusions: The ethanolic extract is slightly innocuous or non-toxic according to the CYTED categorization.

Keywords: artemia, toxicity, survivorship, anxiety.

1. Introducción

Actualmente la medicina tradicional representa una alternativa importante dentro del sistema de salud en el mundo (1), de manera especial en las comunidades, distintas plantas medicinales se suelen utilizar en base a recomendaciones que provienen de generación en generación (2), sin embargo no todas las plantas utilizadas han sido evaluadas verificando su potencial toxicidad. Hace algunos años la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que, en países emergentes, el 80% de la población la utiliza para tratar enfermedades y su efectividad se ha comprobado a través de la observación y experimentación de sus proveedores y usuarios (3).

El tratamiento de las enfermedades con plantas medicinales es común en distintos países incluyendo el Perú, sin embargo, en la mayoría de veces el uso es de manera empírica, y no hay suficiente evidencia sobre estudios que permitan evaluar si es una dosis correcta o tóxica para el ser humano, en el posible caso de que presenten metabolitos secundarios dañinos para el organismo (2,3,4).

La importancia de realizar un estudio de toxicidad es que se pueda comprobar si determinadas plantas medicinales llegan a producir algún efecto a nivel celular (5), que afecte al organismo expuesto, llegando a producir la muerte, hoy en día estos estudios pueden desarrollarse en diversas especies de animales como roedores, peces, crustáceos y en algunos casos en líneas celulares humanas, lo que permite investigar sus efectos en el abordaje terapéutico de neoplasias y sus efectos como analgésicos, trombolíticos, hipoglucemiantes, ansiolíticos, entre otros (6,7). Los estudios en distintas variedades de crustáceos han sido importantes para investigar efectos de plantas medicinales gracias a la facilidad de su adquisición y mantenimiento en el laboratorio, entre estos se encuentran la *Artemia salina* y *Artemia franciscana* (8,9,10). El uso de esta especie en estudios experimentales preclínicos ha ido incrementándose (11) y promoviendo el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en las áreas de oncología (12,13), infectología (11,14) y neurología (15,16).

Okumu MO. et al realizaron un bioensayo de letalidad utilizando *Artemia salina* como modelo animal para evaluar toxicidad de veneno de serpientes como *Bitis arietans*, *Naja ashei* y *Naja subfulva* utilizando el método PROBIT generando un antecedente de estudios preclínicos de toxicidad basado en este método estadístico, resaltando la importancia de seguir contribuyendo con la producción de más evidencia basada en este tipo de investigaciones debido a las ventajas de realización y los distintos usos

que pueden tener en el amplio campo de la farmacología básica (17).

La búsqueda de modelos alternativos para estudios toxicológicos en plantas medicinales es una preocupación latente de la comunidad científica, diversos medicamentos que provienen de estas fuentes naturales suelen emplearse para el manejo de diversas enfermedades pero requieren un adecuado estudio preclínico debido a la toxicidad sistémica que poseen a menudo, por esta razón el uso de ensayos de letalidad con *Artemias* en estadio de nauplio viene siendo una opción importante para llenar un vacío que muchas veces pasa desapercibido (18).

Gil J. et al evaluaron el efecto de hojas de *Passiflora tripartita* en la ansiedad de 20 ratones, los cuales fueron colocados de forma aleatoria en 4 grupos, recibiendo respectivamente lo siguiente: por vía intraperitoneal VIP 0.1 ml de solución salina, diazepam 1 mg/Kg, dosis de 200 mg/Kg p.c y 100 mg/Kg p.c de extracto etanólico al 45% de *Passiflora tripartita*. En esta investigación fue determinante la medición de los niveles de ansiedad usando el Test de esfera enterrada, donde los resultados obtenidos demostraron que los especímenes expuestos a los extractos enterraron menos esferas, es decir presentaron menores niveles de ansiedad, calculados por sus promedios. Además, se evidenció una respuesta más relativamente cercana a la de la exposición de los extractos con el grupo que se le administró diazepam teniendo una media de $2 \pm 2,34$. Se concluyó en este estudio que la dosis de 200 mg/kg p.c y 100 mg/kg p.c reduce los niveles de ansiedad significativamente (19).

Por otro lado, Nerdy N. et al se plantearon objetivos para examinar científicamente los efectos protectores de tres variedades de *Passifloras*: *P. edulis* conocida como Maracuyá púrpura, *P. ligularis* o Maracuyá rojo y *P. verrucifera* conocida como Maracuyá amarillo en ratas albinas, frente a toxicidad hepática inducida por paracetamol y toxicidad renal inducida por gentamicina, para lo cual se extrajeron los metabolitos de tres variedades de cáscaras de maracuyá por método de maceración y se dió el tratamiento antes de la inducción. Para evaluar la actividad hepatoprotectora se analizó bioquímicamente la alanina transaminasa y aspartato transaminasa y para la actividad nefroprotectora se evaluó la urea y creatinina. La actividad hepatoprotectora para el control positivo fue similar a los 250 mg/Kg de peso corporal de extracto de cáscaras de maracuyá púrpura y roja y a 500 mg/Kg de peso corporal de extracto de cáscara de maracuyá amarilla. La actividad nefroprotectora para el control positivo (50 mg de silimarina por kg de peso corporal) fue similar a los

250 mg/Kg de peso corporal de extracto de cáscara de maracuyá púrpura y a 500 mg/Kg de peso corporal de extracto de cáscaras de maracuyá roja y de maracuyá amarillo. Los extractos mostraron actividades hepatoprotectora y nefroprotectora dependientes de la dosis. Ambas actividades fueron mayores en el extracto de cáscara de maracuyá púrpura en comparación con el extracto de cáscara de maracuyá rojo y el extracto de cáscara de maracuyá amarillo (20).

Por otro lado, Aba M. et al reportan que podría presentarse de acuerdo a la dosis administrada, una toxicidad hepática y nefrotóxica en ratas, al consumirse algunos extractos de frutos de plantas como *Averrhoa carambola* conocida como carambola, donde se trató treinta y cinco ratas asignadas en siete grupos (n=5), con dosis variables del jugo (0, 250, 500, 1000, 2000, 4000 y 5000 mg/kg de peso corporal) para estudios de toxicidad aguda. A otras 20 ratas para el estudio de toxicidad sub aguda, se les organizó en cuatro grupos (A-D) (n=5) a las que se les administró el jugo a 0, 600, 400 y 200 mg/kg de peso corporal por vía oral durante 28 días. El día 29 se recogieron sangre entera, sueros y órganos vitales para estudio hematológico. Los resultados del estudio agudo indican que el jugo era seguro incluso a 5000 mg/kg después de 48 h. en el estudio de toxicidad subaguda, no hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en todos los parámetros hematológicos, proteína total, albúmina y valores de globulina de los grupos tratados en comparación con los del grupo control. Las actividades de aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y fosfatasa alcalina, así como los valores de urea, creatinina y malondialdehído de las ratas tratadas con el jugo fueron significativamente ($p < 0,05$) más altas que las del grupo control de forma dependiente de la dosis. La histomorfología hepática y renal de las ratas tratadas con el jugo mostraron lesiones de degeneración y necrosis al compararlas con las del control, concluyendo que el jugo de *A. carambola* es tanto nefrotóxico como hepatotóxico, pero no tuvo efectos deletéreos sobre la hematología (21)

En estudios previos tales como los de Abalaka et al se planteó investigar en parámetros hematológicos, la toxicidad aguda del extracto etanólico de la corteza del tallo de *Adenium obesum* (Forssk) Roem. & Schult en ratas Wistar. Con una administración de dosis única de 300 mg/kg, 2000 mg/kg y 5000 mg/kg del extracto por sonda oral por separado a tres grupos diferentes de ratas hembra (n=3), evaluando la mortalidad y/o morbilidad durante 14 días, al final de los cuales no se

presentó signos de toxicidad, morbilidad o mortalidad. La dosis letal (LD50) del extracto fue ≥ 5000 mg/kg (sin clasificar) según el límite fijo de los valores de LD50. El peso corporal final de las ratas control ($196,00 \pm 3,06$ g) fue significativamente ($p < 0,05$) mayor que el peso corporal inicial ($184,30 \pm 1,45$ g) y la ganancia de peso en los grupos tratados con extracto no fue significativa ($p > 0,05$). El volumen de células empaquetadas, recuento de glóbulos rojos y concentraciones de hemoglobina en las ratas ($42,67 \pm 1.33$ %, $5.10 \pm 0.20 \times 10^{12}$ L⁻¹ y 130.70 ± 2.96 gL⁻¹, respectivamente no cambiaron significativamente ($p > 0,05$). Sin embargo, el recuento de glóbulos blancos aumentó significativamente de $7,50 \pm 0,63 \times 10^9$ a $11,63 \pm 0,50 \times 10^9$ L⁻¹ mientras que el recuento de linfocitos aumentó significativamente de $5,81 \pm 0,43 \times 10^9$ a $9,99 \pm 0,42 \times 10^9$ L⁻¹ ($p < 0.05$) a la mayor dosis de extracto (5000 mg/kg) en comparación con sus respectivos controles. En este estudio se concluyó que *Adenium obesum* podría no ser hematotóxica y se considera una planta medicinal segura en su administración por vía oral (22).

La familia Passifloraceae se encuentra dentro de las plantas medicinales que son utilizadas de manera empírica con diversos objetivos terapéuticos (23). Estudios refuerzan su potencial uso como alternativas terapéuticas para el tratamiento de la hipertensión, ha sido estudiada su composición química y su bioactividad por Jiménez-Rodríguez et al. donde se evaluó el potencial antihipertensivo de extractos macerados con etanol al 97% de la harina de semillas de *Passiflora vitifolia* y *Passiflora edulis*, donde se caracterizaron los metabolitos mediante ensayos cualitativos, cuantitativos y UHPLC para evaluar la citotoxicidad, potencial antihipertensivo in vivo, efecto vasodilatador y posibles mecanismos de acción in vitro. Los extractos no presentaron toxicidad aparente, pero mostraron un efecto preventivo de la HTA, inhibiendo la contracción de angiotensina-II (AT-II), y presentando relajación de los anillos aórticos contraídos con fenilefrina y KCl que fue revertida parcialmente en presencia de L-NAME lo que sugiere que se producen posibles mecanismos de activación de la síntesis de NO e inhibición o antagonismo de AT-II. (24). Asimismo, esta familia es reconocida por su efecto ansiolítico y existen estudios publicados sobre la variedad Ligularis en el Perú que concluyen que posee un efecto depresor del sistema nervioso (23).

Devaki et al. realizaron estudios de toxicidad de *Passiflora edulis* en ratas albinas Wistar a quienes se les administró por vía oral extracto acuoso de hojas de *Passiflora*

edulis. Las pruebas de toxicidad aguda se realizaron administrando 200, 500, 1000 y 2000 mg/kg de peso corporal del animal. En el estudio subagudo, se les administró varias dosis de extracto acuoso (100, 200, 300 y 400 mg/kg de peso corporal) para evaluar su toxicidad durante 7 días. Se pesó los órganos, marcadores hematológicos, renales y hepáticos. En el estudio de toxicidad aguda, no se observó mortalidad a las 24 h de la administración del extracto de *P. edulis*. Sin signos de cambios neurológicos, los cambios de comportamiento se notaron en 72 h. En el estudio subagudo, la ingesta de extracto no cambió los parámetros hematológicos como glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas y también se encontró que el nivel plasmático de aminotransferasas, urea, ácido úrico y creatinina tampoco fueron alterados por la administración de extracto de *P. edulis* durante todo el estudio. Se encontró que el peso del órgano no se alteraba en todas las dosis seleccionadas de la toxicidad aguda. El estudio revela que se encontró que la administración oral del extracto era segura hasta el nivel de dosis de 2000 mg/kg. El estudio subagudo indicó que el extracto es seguro en la función de la médula ósea y no es hepatotóxico ni nefrotóxico. Esto respalda el uso seguro del extracto acuoso de *P. edulis* en estudios farmacológicos, promoviendo el interés por la realización de estudios de toxicidad aguda que generen un antecedente preclínico para la evaluación de un potencial uso de plantas medicinales en el manejo de enfermedades que afecten al sistema nervioso u otro sistema del cuerpo humano (25,26).

Considerando que la población utiliza con alta frecuencia las plantas medicinales y que no existen estudios sistemáticos que reflejen la dosis letal y los efectos adversos, de *Passiflora tripartita*, existiendo un vacío que debe llenarse de manera que la seguridad de su uso contribuya realmente a una actitud preventiva y enfoque terapéutico en la salud de la comunidad. Integrando la medicina tradicional y biomolecular al sistema de salud liderado por el Ministerio de Salud del país y teniendo en cuenta que a pesar del consumo de la variedad Tripartita no se han reportado publicaciones sobre su efecto tóxico en *Artemia franciscana*, se planteó el presente estudio de exposición a dosis creciente de *Passiflora tripartita* con la intención de contribuir en brindar la seguridad de su uso en beneficio de la población, además de buscar generar un antecedente de investigación sobre su efecto en la sobrevivencia en una población como el crustáceo que cumple con los marcos éticos en investigación experimental de estudios preclínicos.

2. Enunciado del problema

¿Cuál es el grado de toxicidad del extracto etanólico de *Passiflora tripartita* sobre la supervivencia de *Artemia franciscana*?

3. Hipótesis

- **Hipótesis nula [H0]:**

El extracto etanólico de *Passiflora tripartita* no tiene efecto tóxico sobre la supervivencia de *Artemia franciscana*.

- **Hipótesis alterna [H1]:**

El extracto etanólico de *Passiflora Tripartita* tiene efecto tóxico sobre la supervivencia de *Artemia franciscana*.

4. Objetivos

General:

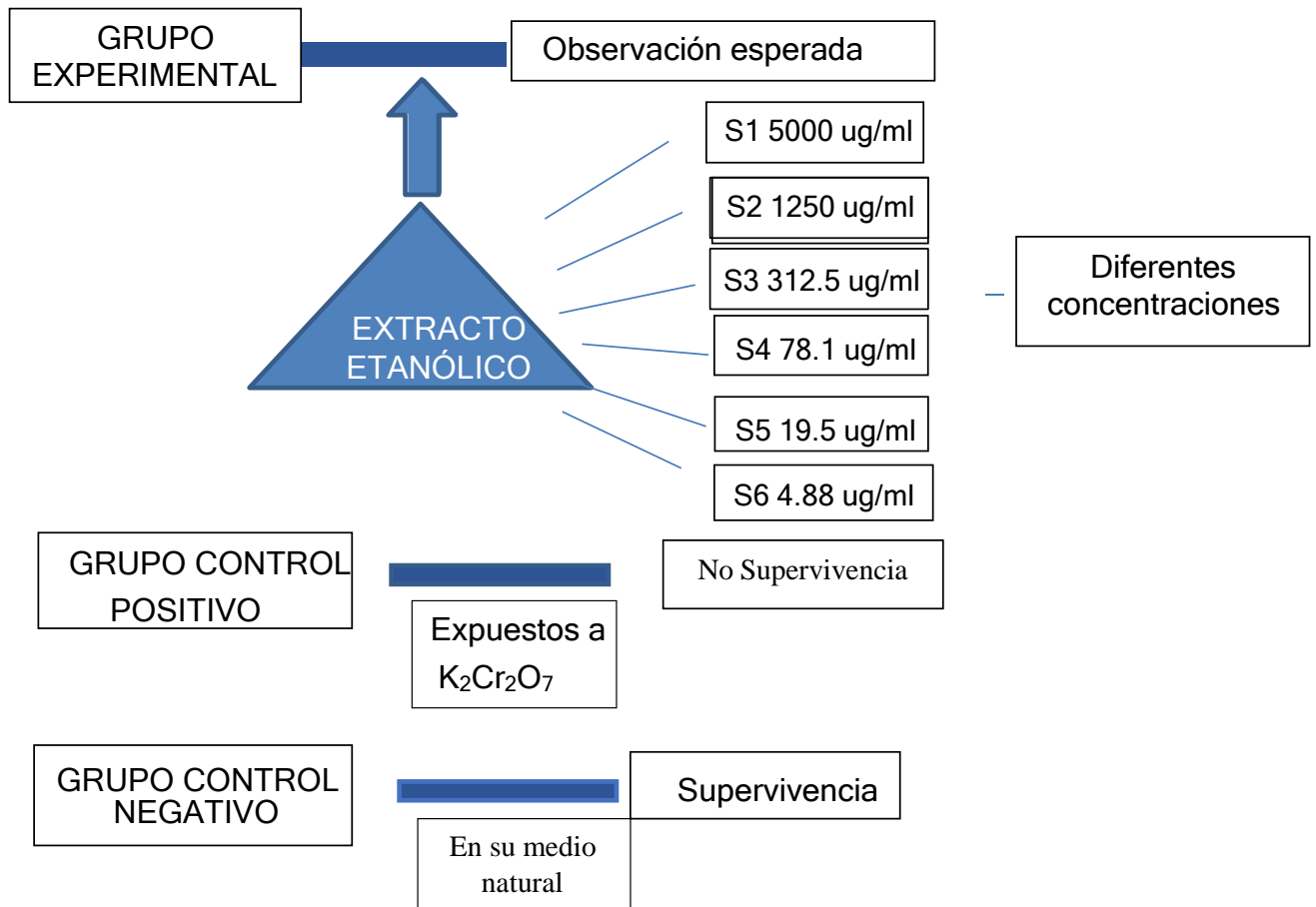
- Evaluar el grado de toxicidad de extracto etanólico de *Passiflora tripartita* sobre la supervivencia de *Artemia franciscana*.

Específicos:

- Determinar la frecuencia de supervivientes de nauplios (*Artemia franciscana*) no expuestos al extracto etanólico de *Passiflora tripartita*.
- Determinar la frecuencia de supervivientes de nauplios (*Artemia franciscana*) expuestos al extracto etanólico de *Passiflora tripartita*.
- Determinar la concentración del extracto etanólico de *Passiflora tripartita* con efecto tóxico sobre nauplios de *Artemia franciscana*.
- Determinación de metabolitos secundarios cualitativamente por marcha fitoquímica en extracto etanólico de *Passiflora tripartita* según método Olga Lock.

5. Material y métodos

5.1 Diseño de estudio: Investigación básica. Experimental. Basado en modelo de investigación cuantitativa experimental según clasificación de Hernández Sampieri.



5.2 Población, muestra y muestreo:

5.2.1. Población diana: *Artemia franciscana* en estadio de nauplio.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

- PESO: 0,1 gr de *Artemia franciscana*.

- ESTADIO EVOLUTIVO: Huevos que eclosionaran para el estudio

- TIEMPO EVOLUTIVO: 24 a 48 horas

- PROCEDENCIA: Bahía de San Francisco- Estados Unidos

Criterios de exclusión

- ESTADIO EVOLUTIVO: Huevos que no eclosionaron

- TIEMPO EVOLUTIVO: Mayor a 48 horas.

5.2.2 Muestra

Unidad de análisis: Tubos de ensayo con *Artemia franciscana* expuestos a extracto etanólico de *Passiflora tripartita*

5.2.3 Muestreo: Se eligió a cada grupo de forma no probabilística.

5.3 Definición operacional de las variables:

| VARIABLES | NOMBRE | TIPO | ESCALA DE MEDICION | DEFINICION OPERACIONAL | INDICADOR |
|-------------------------------|--|--------------|--------------------|---|--|
| Variable Independiente | Toxicidad del extracto etanólico de <i>Passiflora tripartita</i> . | CUANTITATIVA | Discreta | Cantidad de extracto etanólico de <i>Passiflora tripartita</i> que produce la muerte de nauplios. | GRADO DE TOXICIDAD según CYTED. I. Extremadamente tóxico: 1 - 10 ug/ml II. Altamente tóxico: 10 - 100 ug/ml III. Moderadamente tóxico: 100 - 500 ug/ml IV. Ligeramente tóxico: 500 - 1000 ug/ml V. Prácticamente no tóxico: 1000 - 1500 ug/ml VI. Relativamente Inocuo: > 1500 ug/ml |

| | | | | | |
|-----------------------------|---|--------------|----------|---|---------------------------|
| Variable Dependiente | Supervivencia de nauplios (<i>Artemia franciscana</i>) expuestos a extracto etanólico de <i>Passiflora tripartita</i> . | CUANTITATIVA | DISCRETA | Número de nauplios vivos después de la exposición al extracto etanólico de <i>Passiflora tripartita</i> . | Concentración letal media |
|-----------------------------|---|--------------|----------|---|---------------------------|

Definición conceptual de las variables:

VARIABLES

- **VARIABLE INDEPENDIENTE:** Toxicidad del extracto etanólico de *Passiflora tripartita*.
- **VARIABLE DEPENDIENTE:** Supervivencia de nauplios (*Artemia franciscana*) expuestos a extracto etanólico de *Passiflora tripartita*.

5.4 Procedimientos y técnicas:

5.4.1 Método

- Para la evaluación de toxicidad de *Passiflora tripartita* a distintas concentraciones sobre la supervivencia de *Artemia franciscana*; se realizó la colecta, tamiz, maceración y rota evaporación de la planta en cuestión. Al final de los procesos se obtuvo una muestra de extracto etanólico que pasó por etapas de diluciones.
- Se procedió a la eclosión de huevos de *Artemia franciscana* hacia un estadio de nauplio, para que estos puedan ser expuestos por 24 horas en un medio específico. De acuerdo a lo propuesto en nuestro diseño se formaron 3 grupos: grupo experimental, grupo control positivo y grupo control negativo. Se realizó la distribución de 20 nauplios de Artemia en cada tubo de ensayo perteneciente a los grupos formados, utilizándose un total de 640 Artemias.
- El Grupo experimental o grupo problema, estuvo conformado por Artemias expuestas a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Passiflora tripartita* para comprobar si existió toxicidad; verificando la supervivencia de nauplios y determinando la concentración letal media según el Método CDCM061312 Universidad de San Francisco y CYTED.
- El Grupo control negativo estuvo conformado por Artemias en su medio natural.
- El Grupo control positivo se conformó por Artemias que fueron expuestas a una solución de dicromato de potasio.

5.4.1.1. Recolección, identificación y tratamiento de la planta (19)

a. Recolección, Identificación taxonómica.

- Se colectó las plantas entre las 9:00 y 15:00 horas del día, en el cerro “La Botica” ubicado en Cachicadán Latitud: -8.09472, Longitud: -78.1489 8° 5' 41" Sur, 78° 8' 56" Oeste.
- Se identificó en el Herbario Antenor Orrego (HAO) confirmándose la identidad como *Passiflora tripartita* var. *mollísima* (Kunth) Holm-Niels & P. Jorg (Passifloraceae) HAO-20120 con la Constancia de depósito N° 01-2019-HAO-UPAO.

b. Tratamiento de la planta

- Se seleccionó las hojas, deshidratándolas a temperatura ambiente bajo sombra por 96 horas. Se sometió a un tamiz de 0.5 mm, conservando el producto obtenido en frascos protegidos de la luz solar.

5.4.1.2. Elaboración del extracto, diluciones, conformación de series y análisis fitoquímico de la planta

a. Elaboración del extracto etanólico.

- A partir de la rebaja de 0.938 L alcohol al 96° con la adición de 1.062 L de agua destilada se obtuvo 2L de alcohol al 45°, utilizando la siguiente fórmula de dilución:

$$C1.V1 = C2.V2$$

$$96°.V1=45°.2L$$

-Se colocó 97 g de hojas secas a temperatura ambiente tamizadas de *Passiflora tripartita* en 2 L de alcohol(solvente) de 45° y se maceró por 7 días, agitándose diariamente, protegiendo el frasco con papel aluminio, manteniéndolo en un lugar oscuro para que sus propiedades sean conservadas.

-El día 8 se rota evaporó y se llevó al día siguiente a una estufa a 37C° durante 24 horas para eliminar la humedad, obteniéndose al final 6.13 g de muestra.

b. Diluciones.

b.1. Dilución de extracto de planta.

-Se pesó 100 mg de lo obtenido y se mezcló con 2 ml de solución salina al 3.5%.

b.2. Dilución para preparar la solución madre.

De la primera dilución de extracto de planta, se extrae 1.2 ml y se coloca en un tubo de ensayo donde hay 10.8 ml de solución salina al 3.5%.

-Este tubo que contiene en total 12 ml es llamado **solución madre S1**.

b.3 Dilución del extracto solución madre S1, para diluciones sugeridas por CYTED.

-Se preparan 5 tubos de ensayo con 9 ml de solución salina al 3.5% nombrados como S2 S3 S4 S5 S6.

- Del tubo **solución madre S1**, se trasvasa 3 ml al tubo S2, quedando 9 ml en este tubo que pasa a denominarse S1 y obteniéndose 12 ml de solución en tubo S2.

- Se agita la solución del tubo S2 y se trasvasa 3 ml al tubo S3, quedando 9 ml en el tubo S2 y obteniéndose 12 ml de solución en el tubo S3.

- Se procede de igual manera con los tubos S3, S4, S5 hasta preparar el tubo S6, con 12 ml de solución, se agita la solución y de este último tubo se descarta 3 ml para que todos los tubos desde S1 al S6 contengan uniformemente el volumen de 9 ml, pero con una concentración decreciente del extracto en ug/ml según protocolo del CYTED (27).

b.4. Conformación de pruebas de toxicidad del extracto con repeticiones a partir

de las series preparadas.

- De la solución de 9 ml contenida en el tubo S1 se toma 2 ml para colocar en cada uno de cuatro tubos de ensayo denominados T1, T2, T3 y T4, los cuales son repeticiones propuestas para el análisis estadístico PROBIT.

- De la misma forma se preparan las 4 repeticiones de los tubos S2, S3, S4, S5 y S6 trabajándose al final con un total de 24 tubos.

- A cada tubo de las 6 series (S1, S2, S3, S4, S5 y S6) con cuatro repeticiones cada serie, se le incorpora 20 nauplios de *Artemia franciscana* exponiéndolas a los 2 ml de extracto en diferentes concentraciones contenidos en los 24 tubos por un tiempo de 24 horas.

c. Análisis fitoquímico:

- Luego de rota evaporar, se utilizó el método de Olga Lock de Ugaz para determinar los metabolitos secundarios del extracto etanólico y acuoso mediante reacciones de coloración y precipitación (28).

Se efectuaron las siguientes reacciones: Fehling, Baljet, Lieberman – Burchard, resina, espuma, mucílago, Cloruro férrico, Ninhidrina, Bortranger, Shinoda, Antocianidina, Dragendorff, Mayer y Wagner para determinar la presencia de metabolitos secundarios de la planta y se registró en el anexo 3 en la Tabla 3.

Obtención de las larvas de *Artemia franciscana* (27)

a. Preparación del medio y eclosión de *Artemia franciscana*:

- Se preparó el medio con 9 g de NaCl en 500 mL de agua destilada y se agregó 0.1 g de *Artemia franciscana* dejando en reposo por una hora, se protegió de la luz el matraz con papel de aluminio.
- Después de 1 hora de hidratación, se añadió los 8.5 g de sal restante, quedando una solución con 17.5 g para 500 ml de agua destilada
- Se colocó 1 foco de 40W aproximadamente a 5 cm de lado izquierdo y otro a lado derecho manteniendo la uniformidad de la iluminación, se creó una zona de oscuridad y la otra zona con luminosidad, dejándose con el dispositivo de aireación por 24 a 48 horas a una temperatura de aproximadamente 20°C para la eclosión de los huevos y el inicio de la fase de nauplios que se observó cuando atravesaban el campo de luz.

b. Ensayo de letalidad en larvas de *Artemia franciscana* (27)

- Se apagó el dispositivo de aireación y el foco de luz después de haber transcurrido

las primeras 24 horas de incubación y se preparó el sistema de análisis con tubos de vidrio conformándose: Grupo control negativo, grupo control positivo y grupo experimental según el Método CDCM061312. Universidad de San Francisco.

- Para exponer las Artemias en estadio de nauplio, fue de vital importancia haber realizado las respectivas diluciones y la obtención de concentraciones en ug/ml sugerido por CYTED. El grupo conformado por 6 series con 4 tubos cada serie. A los 4 tubos de cada serie se le adicionó 20 nauplios y se dejó en exposición por 24 horas, cubiertos con papel de aluminio, iluminado con la bombilla de 40W, al cabo de este tiempo se procedió al conteo de los nauplios de todos los tubos.
- Se contrastó la supervivencia o ausencia de esta con el conteo de nauplios colocados en los 4 tubos correspondiente al control positivo (S+) y los 4 tubos correspondientes al control negativo (S-), conteniendo cada tubo utilizado 20 artemias en estadio de nauplio expuesto por 24 horas.

c. Conteo del nauplio

- Se realizó el conteo de nauplios con supervivencia y ausencia de esta con apoyo de micropipeta, registrándose por separado los del grupo experimental, control positivo y control negativo. Se sumó el total de cada serie y repetición correspondiente del grupo experimental para el análisis estadístico.

5.5 Plan de análisis de datos (27)

- La CL₅₀(concentración letal media) se determinó mediante el método PROBIT.
- Se utilizó una ecuación lineal obtenida del gráfico de dispersión basado en el anexo 4.

$$Y = m.X + b$$

Dónde:

X: Concentración letal media, concentración necesaria para matar al 50% de los nauplios.

Y: valor sugerido por método PROBIT

m: Pendiente de la recta.

B: Intercepto de la recta.

El grado de toxicidad del extracto se definió en función del rango en que se encuentren

los valores de la CL50 de acuerdo con las siguientes categorías del CYTED:

Clasificación de la toxicidad según CYTED.

| | |
|----------------------------|-------------------|
| I. Extremadamente tóxico | 1 - 10 ug/ml |
| II. Altamente tóxico | 10 - 100 ug/ml |
| III. Moderadamente tóxico | 100 - 500 ug/ml |
| IV. Ligeramente tóxico | 500 - 1000 ug/ml |
| V. Prácticamente no tóxico | 1000 - 1500 ug/ml |
| VI. Relativamente Inocuo | > 1500 ug/ml |

5.6 Aspectos éticos:

Se aplicaron los principios expuestos en 1959 por Russell y Burch, en su publicación “The principles of humane experimental Technique”, y el estudio fue desarrollado en atención a la Directiva Europea del 22 de Setiembre del 2010.

Se obtuvo además la aprobación del comité de bioética de la universidad (Resolución N°0258-2022-UPAO).

6. Resultados:

Tabla 1. Frecuencia de supervivencia y porcentaje de mortalidad de *Artemia franciscana* después de 24 horas de exposición a extracto etanólico de *Passiflora tripartita*.

| Muestra | | Extracto etanólico de <i>Passiflora tripartita</i> | | | | | |
|--------------------------------------|------------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | 5000 | 1250 | 312.5 | 78.1 | 19.5 | 4.88 |
| Dosis (ug/ml) | | 5000 | 1250 | 312.5 | 78.1 | 19.5 | 4.88 |
| Log 10 cc | | 3.699 | 3.097 | 2.495 | 1.893 | 1.29 | 0.688 |
| | | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 |
| Nauplios (npl) | | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 |
| | | npl | npl | npl | npl | npl | npl |
| T1 20 npl | T1 supervivencia | 15 | 18 | 19 | 19 | 19 | 19 |
| | T1 mortalidad | 5 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | % mortalidad | 25 | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | PROBIT 1 | 4.326 | 3.718 | 3.355 | 3.355 | 3.355 | 3.355 |
| T2 20 npl | T2 supervivencia | 16 | 18 | 18 | 19 | 19 | 20 |
| | T2 mortalidad | 4 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| | % mortalidad | 20 | 10 | 10 | 5 | 5 | 0 |
| | PROBIT 2 | 4.158 | 3.718 | 3.718 | 3.355 | 3.355 | 0 |
| T3 20 npl | T3 supervivencia | 15 | 17 | 18 | 18 | 19 | 19 |
| | T3 mortalidad | 5 | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| | % mortalidad | 25 | 15 | 10 | 10 | 5 | 5 |
| | PROBIT 3 | 4.326 | 3.964 | 3.718 | 3.718 | 3.355 | 3.355 |
| T4 20 npl | T4 supervivencia | 17 | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 |
| | T4 mortalidad | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | % mortalidad | 15 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | PROBIT 4 | 3.964 | 3.355 | 3.355 | 3.355 | 3.355 | 3.355 |

Interpretación:

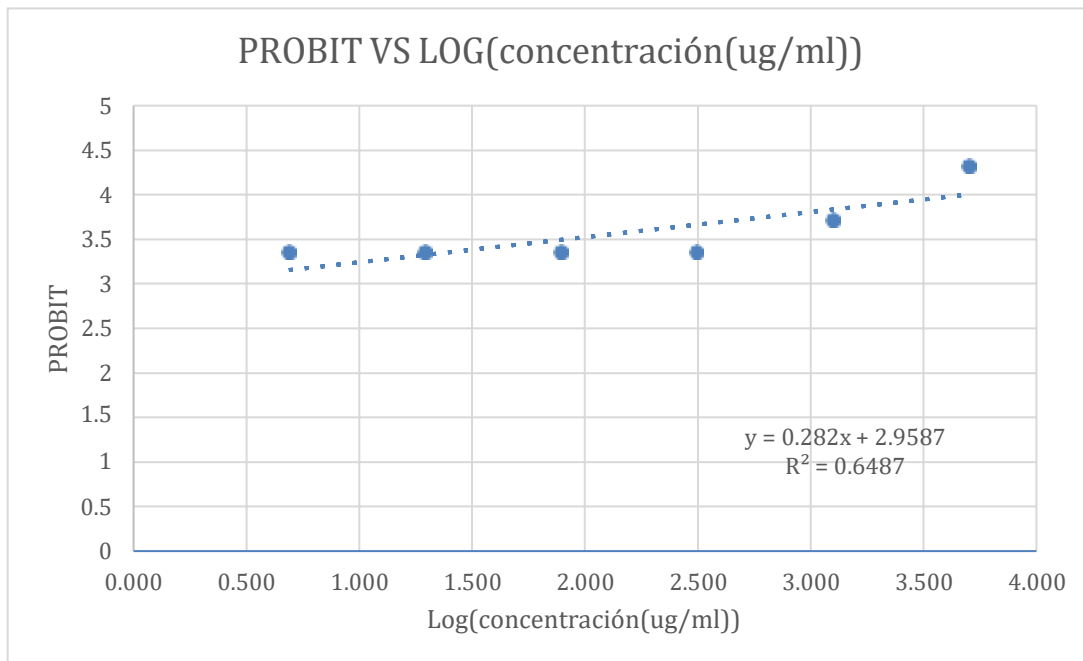
La tabla muestra resultados obtenidos con la prueba PROBIT, que es una prueba estadística para estudios de sistemas de toxicidad, en este caso en nauplios (npl),

además de frecuencia de supervivencia, mortalidad y porcentaje de la misma.

S1: Serie1, **S2:** Serie2, **S3:** Serie 3, **S4:** Serie4, **S5:** Serie5, **S6:** Serie6, son series que contienen diferente concentración. **T1:** Tubo 1. **T2:** Tubo 2, **T3:** Tubo 3, **T4:** Tubo 4 son repeticiones de una misma concentración de extracto. **Supervivencia:** Número de nauplios vivos en cada tubo. **Ausencia de Supervivencia o Mortalidad:** Número de nauplios que no presentan movilidad frente a estímulos. Desde la serie S1 a la S6 se observa una disminución de la concentración del extracto. La serie S1 representa el enfrentamiento de nauplios a una concentración de 5000 ug/ml y la serie S6 a una concentración de 4.88 ug/ml.

En las 6 series se observa supervivencia de los nauplios en las 4 repeticiones de los tubos. Como en cada tubo se contó del total de 20 nauplios, se observa que la mayor mortalidad se presenta en la Serie 1 que contiene el extracto con mayor concentración, donde se observa desde 3 nauplios muertos (15%) en el Tubo 4 hasta 5 nauplios (25%) en el Tubo 3 y Tubo 1. Es importante resaltar que el conteo se realizó con microscopio óptico y micropipeta.

Figura 1. Curva de toxicidad aguda de *Passiflora tripartita* sobre *Artemia Franciscana*. Relación %mortalidad vs Log concentración.



Interpretación:

Esta figura es un gráfico de dispersión que representa la esencia del presente trabajo, en esta se expresa una ecuación de la recta que tiene importancia para el cálculo de la CL50 y la clasificación del perfil de toxicidad según CYTED.

La curva de toxicidad muestra una línea de correlación ligeramente ascendente, que indicaría una probabilidad de toxicidad relacionada a la concentración del extracto estudiado. En esta se expresa la relación PROBIT vs Log (concentración(ug/ml)).

En la línea de las ordenadas se registró el logaritmo de la concentración ordenados de manera ascendente, que provienen de las 6 series preparadas a diluciones diferentes para el grupo experimental.

En el eje de las abscisas se registra el PROBIT que se relaciona con las probabilidades que se presentan de ocurrir una toxicidad a la concentración empleada. Es relevante tener en consideración que los valores PROBIT provienen de la conversión de porcentajes de mortalidad de la tabla expresada en el anexo 4.

Tabla 2. Comparación de la dosis de toxicidad de *Passiflora tripartita* con valores establecidos por la categorización CYTED

| Muestra | Dosis letal media (CL50) | Perfil de toxicidad según CYTED |
|---|---------------------------------|--|
| Muestra vegetal | 1 - 10 ug/ml | Extremadamente tóxico |
| | 10 - 100 ug/ml | Altamente tóxico |
| | 100 - 500 ug/ml | Moderadamente tóxico |
| | 500 - 1000 ug/ml | Ligeramente tóxico |
| | 1000 - 1500 ug/ml | Prácticamente no tóxico |
| | > 1500 ug/ml | Relativamente Inocuo |
| Extracto etanólico de <i>Passiflora tripartita</i> | 17 324 171.82 ug/ml | Relativamente inocuo |

Interpretación:

La categorización CYTED inicia con dosis muy bajas de algún extracto vegetal, desde 1 ug/ml que se clasifica como Extremadamente tóxico hasta las concentraciones mayores a 1500 ug/ml considerados como Relativamente inocuos.

Para el estudio se encontró que la concentración tóxica del extracto sería una concentración mayor a 1500 ug/ml, pues el valor encontrado fue de 17 324 171.82 ug/ml, lo que indicaría que es un extracto Relativamente inocuo.

7. Discusión:

La evaluación de toxicidad de *Passiflora tripartita* en *Artemia franciscana* desarrollada en el presente trabajo tuvo como resultado el perfil de toxicidad relativamente inocuo según la clasificación CYTED, esto genera un antecedente preclínico de seguridad en su uso. Además, se realizó una marcha fitoquímica cualitativa (28) para conocer los posibles metabolitos existentes en el extracto obtenido, que podrían ser responsables de una acción biológica beneficiosa o tóxica. Es importante conocer estas acciones para que sea utilizada de manera segura, al respecto en el campo de la alimentación, estudios previos han mostrado que *Passiflora tripartita* es una rica fuente de metabolitos antioxidantes relacionada precisamente a los metabolitos que se encontraron en este estudio mostrados en el anexo 3, compuestos fenólicos y flavonoides (29).

Asimismo, existen estudios en el campo de la salud, realizados con especies de *Passiflora* tales como *Passiflora ligularis* Juss (granadilla) que muestran el uso para calmar la inflamación, dolor hepático, colesterol alto, escorbuto y alta presión sanguínea que se le atribuye a la presencia de escualeno de manera principal que es un tipo de terpeno también identificado en la *Passiflora* de nuestro estudio (30).

Metabolitos tales como fenoles, flavonoides provenientes de la semilla de *Passiflora tripartita* var. *mollísima*, han sido estudiados maximizando la extracción, rendimiento y contenido total para preparar productos con potencial anti proliferativo, analizando los cambios moleculares en células de cáncer de colon humano aplicando una estrategia multiómica, integrando análisis de transcriptómica y metabolómica lo que permitió la identificación de genes, como MAD2L1 implicado en el metabolismo de poliaminas y glutatión o la inactivación del factor de transcripción NUPR1 que podría estar relacionado con la alteración de los niveles de ceramida intracelular en respuesta al estrés del retículo endoplásmico, el cual es un organelo implicado en la metabolización de xenobióticos a nivel intracelular (31). Reforzando el interés por ampliar la investigación con medios más sofisticados tanto en los procesos de extracción de metabolitos como del estudio de cambios moleculares generados en la población diana.

Asimismo, los metabolitos encontrados en esta investigación como son los alcaloides han sido estudiados dentro de ellos los derivados de la B-carbolina (32), debido a que

son sustancias que se forman al ser los vegetales sometidos a altas temperaturas (33). Estos compuestos, tienen acciones biológicas como ansiolíticos, depresores del sistema nervioso, hipotensores y por presentar efectos adversos posiblemente tóxicos que interfieren en procesos como el aprendizaje y la memoria según algunos estudios (34), por lo que las concentraciones evaluadas son relevantes para el uso de estos productos de manera segura siendo el conocimiento de la dosis tóxica un dato importante para el uso racional de las plantas medicinales.

Toda sustancia de origen sintético o natural con potencial efecto biológico, requiere pruebas de toxicidad que aseguren su uso. Los nauplios de *Artemia franciscana*, están bien considerados como nutrientes en la cadena alimenticia acuática (35). Se consideran un sistema de modelo simple y adecuado para las pruebas de toxicidad aguda de compuestos orgánicos e inorgánicos (36,37), guardando consideraciones éticas internacionales de experimentación en animales. En la tabla 2, se muestra el porcentaje de mortalidad de los nauplios a las 24 horas después de haberse enfrentado al extracto etanólico de *Passiflora tripartita*, se destaca de esta tabla, una mortalidad de 25 % en T1 y T3 con una dosis de 5000 ug/mL, siendo la más alta utilizada, por lo que concluimos en base a la categorización CYTED propuesta que el perfil de toxicidad es ligeramente inocuo. Como puede observarse este cuadro está basado en el grupo experimental que es el grupo de artemias expuestas al extracto y se determinó frecuencia de supervivientes, es importante considerar que la frecuencia de supervivientes según el diseño propuesto en el control negativo es absoluta y en el control positivo la frecuencia de supervivientes es nula debido a la exposición con dicromato de potasio.

Las especies de *Artemia* son utilizadas ampliamente en los estudios eco toxicológicos (38) por su sencillez y rápida manipulación en los laboratorios. Generalmente, se suele observar la eclosión de los quistes, el comportamiento de natación, la reproducción y la supervivencia como en el presente estudio para determinar una toxicidad. Sin embargo, las alteraciones a nivel de ADN que podrían producirse por sustancias en bajas concentraciones en el medio ambiente requerirían que se analicen biomarcadores más sensibles para detectar hasta las más ligeras alteraciones nucleotídicas inducidas por ciertas sustancias que se encuentran en bajas concentraciones en el medio ambiente (39) es por esto que el presente trabajo invita

a la realización de la ampliación de los resultados obtenidos con la consecuente utilización de equipos más sofisticados tanto como para la determinación cualitativa de metabolitos secundarios como para el estudio de alteraciones morfológicas celulares de la población diana utilizada.

En la tabla 2; se obtuvo para *Passiflora tripartita* la concentración letal media (CL50) 17324171.82 ug/ml utilizando el método PROBIT y el perfil de toxicidad relativamente inocuo o no tóxico según la clasificación CYTED , esto se puede contrastar en el conteo de supervivientes y nauplios muertos luego de la exposición a las diversas concentraciones de extractos, que son indicadores utilizados también por otros estudios para establecer el grado de toxicidad de sustancias (40), esta información es sumamente valiosa debido a que podría prevenir de efectos no deseados para el usuario de productos naturales que cada día continúa en incremento, especialmente de zonas alejadas donde estos productos se encuentran en primera línea de uso en las poblaciones rurales más vulnerables.

8.- Limitaciones

El acceso o disponibilidad de los laboratorios de la Universidad debido a las medidas sanitarias impuestas por la pandemia del COVID 19, que retrasaron la evaluación de las etapas de eclosión de los nauplios y la determinación de la supervivencia.

9.- Conclusiones

1. Se determinó que el grado de toxicidad de *Passiflora tripartita* es relativamente inocuo o no tóxico basada en la categorización CYTED empleada.
2. Se determinó la frecuencia de supervivientes tanto para Artemias expuestas a extracto etanólico y no expuestas.
3. Se determinó la concentración de 17324171.82 ug/ml de extracto etanólico de *Passiflora tripartita* como concentración letal media (CL50) sobre *Artemia franciscana*.
4. Se realizó la marcha fitoquímica según método Olga Lock y se encontraron metabolitos secundarios como triterpenos, esteroides, taninos, polifenoles, proteínas, quinonas, glicósidos, alcaloides y flavonoides.

10. Recomendaciones

1. Tener en cuenta que para la eclosión de las Artemias se requiere mantener condiciones estables de temperatura a través de 2 focos que en su conjunto irradian 40 watts, la utilización de un burbujeador pequeño que su accionar no rebalse el medio salino en el que se las coloca y cubrir adecuadamente con papel aluminio el recipiente.

2. Al momento del conteo tener precaución con la manipulación de los nauplios, debido a que en esta etapa de desarrollo las Artemias son pequeñas y frágiles; por lo que esto podría alterar el resultado cuando se las expone al extracto etanólico de *Passiflora tripartita*.

Referencias bibliográficas:

1. Perdomo J. Cuba and the who update their traditional medicine strategies. Rev Cubana Plant Med .2019; 19 (3):264-266.
2. Gallegos M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. Anales de la Facultad de Medicina. 2016;77(4):327.
3. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Informe técnico. Ginebra. Hong Kong. China. 2013;76. www.who.int.
4. Carmona D, Zimmermann A, Kainz K, Pietrocola F, Chen G, Maglioni S, et al. The flavonoid 4,4'-dimethoxychalcone promotes autophagy-dependent longevity across species. Nature Communications. 2019;10(1):1-17.
5. Panda SP, Panigrahy UP, Panda S, Jena BR. Stem extract of *Tabebuia chrysantha* induces apoptosis by targeting sEGFR in Ehrlich Ascites Carcinoma. Journal of Ethnopharmacology. 2019;235(May):219-26.
6. Sharmin T, Rahman MS, Mohammadi H. Investigation of biological activities of the flowers of *Lagerstroemia speciosa*, the *Jarul flower* of Bangladesh. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2018;18(1):1-10.
7. Mole CG, Heyns M. Animal Models in Forensic Science Research: Justified Use or Ethical Exploitation? Science and Engineering Ethics. 2018;1-16. *+
8. Mashjoor S, Yousefzadi M, Zolgharnein H, Kamrani E, Alishahi M. Phyco-linked vs chemogenic magnetite nanoparticles: Route selectivity in nano-synthesis, antibacterial and acute zooplanktonic responses. Materials Science and Engineering. 2019.
9. Peixoto D, Amorim J, Pinheiro C, Oliva-Teles L, Varó I, de Medeiros Rocha R, et al. Uptake and effects of different concentrations of spherical polymer microparticles on *Artemia franciscana*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2019 May; 176:211-8.
10. Ramulondi M, de Wet H, van Vuuren S. Toxicology of medicinal plants and combinations used in rural northern KwaZulu-Natal (South Africa) for the treatment of hypertension. Journal of Herbal Medicine. 2018;(May):2019
11. Dos Santos MA, Da Silva PB, De Toledo LG, Oda FB, Da Silva IC, dos Santos LC, et al. Intravaginal delivery of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland fraction based on a nanoemulsion system applied to vulvovaginal candidiasis treatment. Journal of

Biomedical Nanotechnology. 2019;15(5):1072-89.

12. Lindamulage IK, Soysa P. Evaluation of anticancer properties of a decoction containing *Adenantha pavonina* L. and *Thespesia populnea* L. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2016;16(1):1-8.

13. Canturk Z, Dikmen M, Artagan O, Ozarda MG, Ozturk N. Cytotoxic Effects of Resveratrol, Rutin and Rosmarinic Acid on ARH-77 Human (Multiple Myeloma) Cell Line. Natural Product Communications. 2019;11(10):1934578X1601101.

14. Sánchez E, Rivas C, Castillo S, Leos C, García L, Ortiz DM. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Methanolic Plant Extracts against Nosocomial Microorganisms. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2016;1-8.

15. Montiel RM, Roa JE, Patiño SI, Murrieta FJ, Campos DM. Neuropharmacological and toxicity evaluations of ethanol extract from *Rhodiola rosea*. Drug Development Research. 2012;73(2):106-13.

16. Martínez Medina JJ, Naso LG, Pérez AL, Rizzi A, Okulik NB, Valcarcel M, et al. Synthesis, characterization, theoretical studies and biological (antioxidant, anticancer, toxicity and neuroprotective) determinations of a copper (II) complex with 5-hydroxytryptophan. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2019; 111:26-414.

17. Okumu MO, Mbaria JM, Gikunju JK, Mbuthia PG, Madadi VO, Ochola FO, Maloba KN, Nderitu JG, et al. *Artemia salina* as an animal model for the preliminary evaluation of snake venom-induced toxicity. Toxicon: X.2021;12.

18. Santos M, Vera MS, Epole N, Princiotta S, Díaz Lanza AM, Rijo P, et al. Letalidad Bioensayo usando *Artemia salina* L. J. Vis. Exp. 2022; 188.

19. Gil J, Marín C. Efecto del extracto etanólico de hojas de *Passiflora tripartita* (tumbo serrano) en la ansiedad, en *Mus musculus* var. albinus. Universidad Nacional de Trujillo; 2016.

20. Nerdy N, Ritarwan K. Hepatoprotective Activity and Nephroprotective Activity of Peel Extract from Three Varieties of the *Passion Fruit* (*Passiflora* Sp.) in the Albino Rat. Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. 2019;7(4):536-41.

21. Aba P, Amadi A. Evaluation of the possible hepatotoxic and nephrotoxic potentials of the *Averrhoa carambola* juice extract in female albino rats. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology. 2020;31(1): 20190042.

<https://doi.org/10.1515/jbcpp-2019-0042>

22. Abalaka SE, Fatihu MY, Giginya ND, Ambali SF. Haematotoxicity of Ethanol Extract of *Adenium obesum* (Forssk) Roem & Schult Stem Bark in Wistar Rats. Trop J

Pharm Res, November 2014; 13(11):1 883.

23. Soto MR, Alvarado PA, Rosales L. Phytotherapy based on the fluid extract of *Passiflora ligularis* the treatment of test anxiety. *Medicina Naturista*. 2019;13(1):2019.

24. Jiménez AR, Méndez JA, Murillo WA, Guerrero MF. Vasodilator effect of ethanolic extracts of *Passiflora vitifolia* and *Passiflora edulis f. edulis* seeds. *J Appl Pharm Sci*, 2021; 11(10):061-069.

25. Vasileva L V, Ivanovska MV, Murdjeva MA, Saracheva KE, Georgiev MI. Immunoregulatory natural compounds in stress-induced depression: An alternative or an adjunct to conventional antidepressant therapy? *Food and Chemical Toxicology*. 2019; 127:81-8.

26. Devaki K, Beulah U, Akila G, Gopalakrishnan VK. Effect of aqueous extract of *Passiflora edulis* on biochemical and hematological parameters of Wistar Albino rats. *Toxicology International*. 2012;63 - 67.

27. Vaca E. Evaluación de la toxicidad en *Artemia Salina* del extracto acuoso de las hojas de *Piper aduncum L.* Tesis para optar título profesional de químico farmacéutico. Universidad Nacional de Trujillo. 2019 [Internet]. [citado 20 de enero de 2021]. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/13077/Vaca%20Meza%20Eveleny%20Tirsa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

28. Lock O, editores. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales [Internet]. Departamento Académico de Ciencias PUCP. [citado 20 de enero de 2021]. Disponible en: https://departamento.pucp.edu.pe/ciencias/pub_dpto/investigacion-fitoquimica-metodos-en-el-estudio-de-productos-naturales/

29. Inocente MA, Arias GC, Mauricio SM, Bravo GT, Capcha MF, Cabanillas E, et al. Polyphenols, carotenoids and flavonoids in an antioxidant probiotic yogurt made with tumbo pulp (*Passiflora tripartita Kunth*). *Brazilian Journal of Food Technology*. 2022;25.

30. Armijos C, Ramírez J, Salinas M, Vidari G, Suárez AI. Pharmacology and Phytochemistry of Ecuadorian Medicinal Plants: An Update and Perspectives. *Pharmaceuticals*. 2021; 14:1145.

31. Ballesteros D, Álvarez G, León C, Morantes SJ, Ibáñez E, Parada F, Cifuentes A, Valdés A, et al. Foodomics evaluation of the anti-proliferative potential of *Passiflora mollissima* seeds. *Food Research International*. 2020; 130:108938.

32. Freire VF, Silva GR, Yariwake JH. Análisis dirigido de alcaloides de β -carbolina en

maracuyá ("maracujá") mediante SBSE (PDMS)-LC/Flu y UHPLC-MS. J Brasil química Soc. 2018;29.

33. Wojtowicz E, Zawirska WR, Przygoński K, Mildner SS. Bioactive β -carbolines norharman and harman in traditional and novel raw materials for chicory coffee. Food Chem.2015;280-283.

34. Khan H, Patel S, Kamal MA. Pharmacological and Toxicological Profile of Harmane- β -Carboline Alkaloid: Friend or Foe. Curr Drug Metab. 2018;853-857.

35. Hadi M, Abbas S, Ghorbani R, Sudagar M, Morteza S, et al. Survival, and Stress Resistance of Tiger Barb (*Puntius tetrazona*) Larvae Fed Fish Oil-Enriched *Artemia franciscana* Nauplii. Journal of Applied Aquaculture.2014;

36. Albarano L, Serafini S, Toscanesi M, Trifuoggi M, Zupo V, Costantini M, Vignati D, Guida M, Libralato G, et al. Genotoxicity Set Up in *Artemia franciscana* Nauplii and Adults Exposed to Phenanthrene, Naphthalene, Fluoranthene, and Benzo(k)fluoranthene. Water. 2022; 14:1594.

37. Agostinho M, Moreira M, Ribeiro R. A freshwater amphipod toxicity test based on postexposure feeding and the population consumption inhibitory concentration. Chemosphere. 2012; 87:43-48.

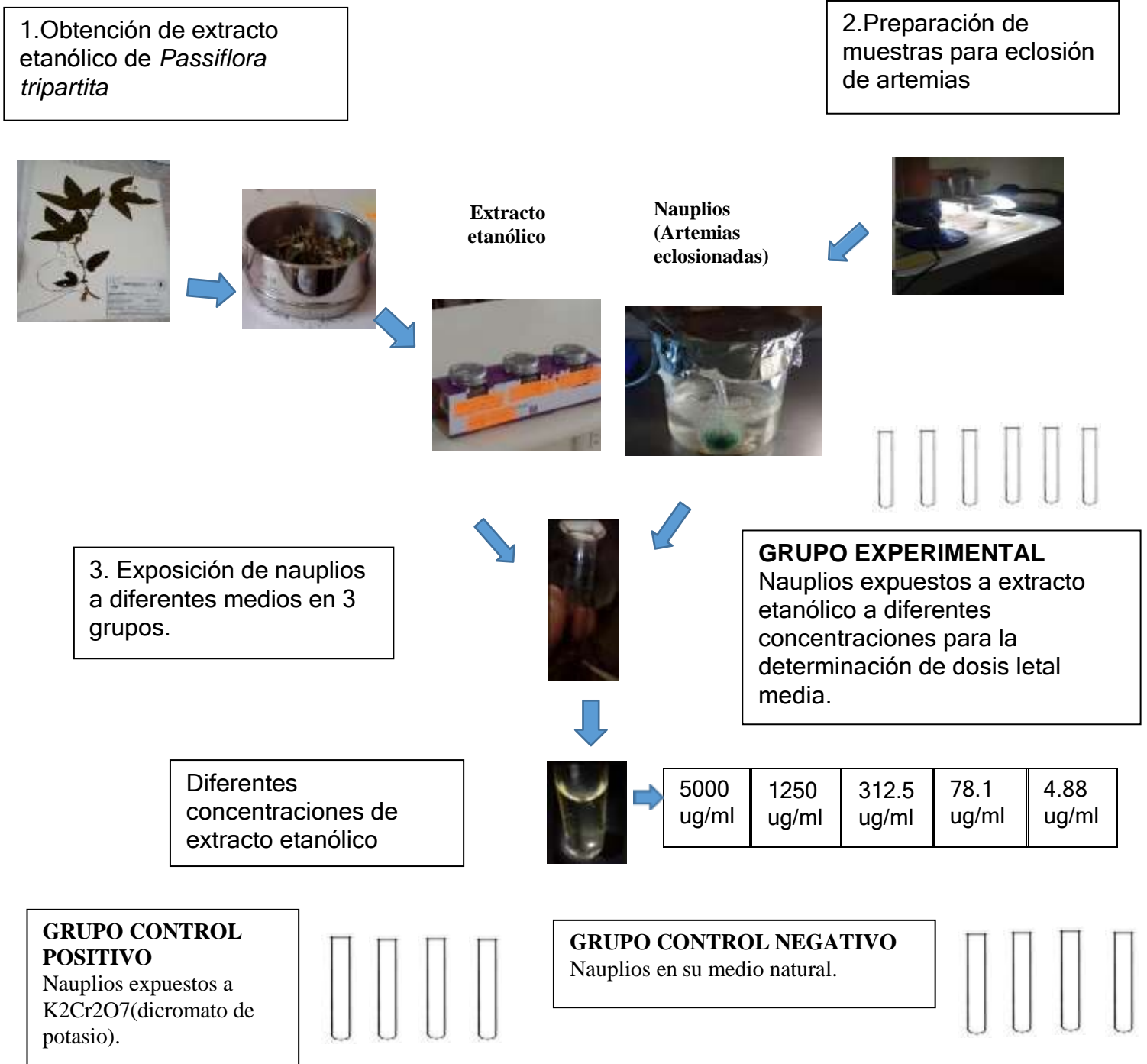
38. Alishahi M, Tulaby Z. Comparative toxicities of five herbicides on nauplii of *Artemia franciscana* as an ecotoxicity bioindicator. 2019.

39. Albarano L, Ruocco N, Lofrano G, Guida M, Libralato G. Genotoxicity in *Artemia spp.*: An old model with new sensitive endpoints. Aquatic Toxicology.2022; 252.

40. Ekonomou G, Lolas A, Castritsi J, Neofitou C, D. Zouganelis G, Tsiropoulos N, et al. Mortalidad y efecto sobre el crecimiento de *Artemia franciscana* expuesta a dos contaminantes orgánicos comunes. Agua. 2019; 11(8):1614.

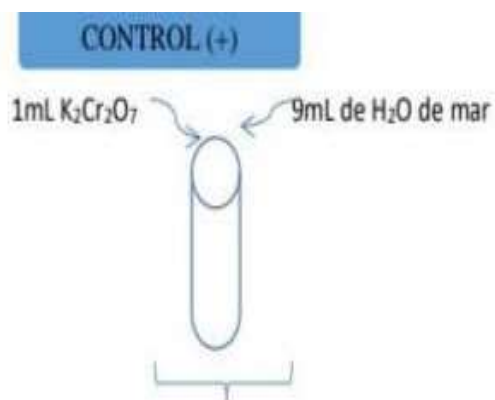
ANEXO 1

Esquematzación del procedimiento en base al diseño del estudio y Método CDCM061312 Universidad de San Francisco y CYTED.

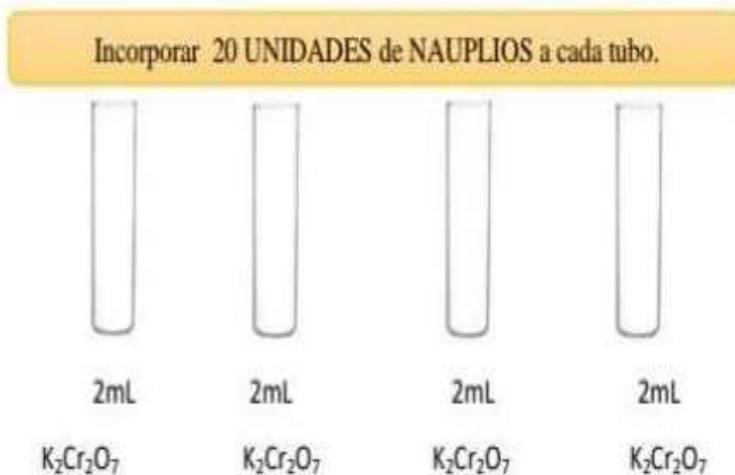


ANEXO 2

CONTROL POSITIVO USANDO DICROMATO DE POTASIO



2 mL a cada uno los dos tubos últimos tubos restantes



NOTA

El volumen de 1 mL de dicromato de potasio utilizado para el control positivo, se extrajo de una solución preparada con 1,2 mg de dicromato de potasio en polvo disuelto en 3 mL de agua destilada.

ANEXO 3

ANALISIS CUALITATIVO DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN MARCHA FITOQUÍMICA SEGÚN MÉTODO OLGA LOCK

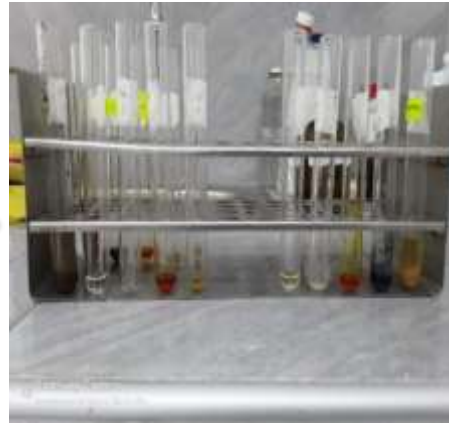


Tabla 3. Determinación fitoquímica cualitativa de metabolitos secundarios presentes en *Passiflora tripartita*. Método Olga Lock.

| Ensayo fitoquímico | Passiflora tripartita | | Metabolitos |
|-----------------------------|-----------------------|-------------------|---|
| | Extracto etanólico | Extracto o acuoso | |
| Ensayo de Resina | - | No realizó | Diversos compuestos, terpenos y alcoholes |
| Ensayo de Fehling | - | + | Azucares reductores |
| Ensayo de Baljet | - | No realizó | Compuestos lactónicos |
| Ensayo de Liberman-Burchart | + | No realizó | Triterpenos y esteroides |
| Ensayo de Espuma | - | + | Saponinas |
| Ensayo de Cloruro Férrico | + | No realizó | Taninos, fenoles |
| Ensayo de Nihidridina | + | No realizó | Proteínas |
| Ensayo de Bortranger | + | No realizó | Quinonas |

| | | | |
|--------------------------------|------------|------------|-----------------------------|
| Ensayo de Shinoda | - | + | Flavonoides |
| Ensayo de Antocianidina | + | No realizó | Glicósidos |
| Ensayo de Dragendorff | + | - | Alcaloides |
| Ensayo de Mayer | + | - | Alcaloides |
| Ensayo de Wagner | + | + | Alcaloides |
| Ensayo de Mucílago | No realizó | - | Estructura de polisacáridos |

Presencia (+), Ausencia (-)

Interpretación: Se observa en la tabla cuando hay reacción positiva, que el extracto presenta triterpenos, esteroides, taninos, polifenoles, proteínas, quinonas, glicósidos, alcaloides y flavonoides.

ANEXO 4

TABLA DE CONVERSIONES UTILIZADA EN MÉTODO PROBIT A PARTIR DEL % MORTALIDAD

Fuente: Finney 1947

Tabla de conversión de frecuencias acumuladas (expresadas en porcentaje) en unidades probit

| UNIDAD | DECENA | | | | | | | | | |
|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
| 0 | - | 3.718 | 4.158 | 4.476 | 4.747 | 5.000 | 5.253 | 5.524 | 5.842 | 6.282 |
| 1 | 2.674 | 3.773 | 4.194 | 4.504 | 4.772 | 5.025 | 5.279 | 5.553 | 5.878 | 6.341 |
| 2 | 2.946 | 3.825 | 4.228 | 4.532 | 4.798 | 5.050 | 5.305 | 5.583 | 5.915 | 6.405 |
| 3 | 3.119 | 3.874 | 4.261 | 4.560 | 4.824 | 5.075 | 5.332 | 5.613 | 5.954 | 6.476 |
| 4 | 3.249 | 3.920 | 4.294 | 4.588 | 4.849 | 5.100 | 5.358 | 5.643 | 5.994 | 6.555 |
| 5 | 3.355 | 3.964 | 4.326 | 4.615 | 4.874 | 5.126 | 5.385 | 5.674 | 6.036 | 6.645 |
| 6 | 3.445 | 4.006 | 4.357 | 4.642 | 4.900 | 5.151 | 5.412 | 5.706 | 6.080 | 6.751 |
| 7 | 3.524 | 4.046 | 4.387 | 4.668 | 4.925 | 5.176 | 5.440 | 5.739 | 6.126 | 6.881 |
| 8 | 3.595 | 4.085 | 4.417 | 4.695 | 4.950 | 5.202 | 5.468 | 5.772 | 6.175 | 7.054 |
| 9 | 3.659 | 4.122 | 4.447 | 4.721 | 4.975 | 5.228 | 5.496 | 5.806 | 6.227 | 7.326 |