

UCUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

Optimización del modelo de pez cebra (*Danio rerio*) para toxicidad de extractos vegetales

Trabajo de titulación previo a
la obtención del título de
Bioquímico Farmacéutico

Autores:

Esteisy Paulina Peralta Córdova

CI: 1105333486

Correo electrónico: peraltaesteisy7@gmail.com

Edisson Homero Bravo Barbecho

CI: 0105719652

Correo electrónico: edibravo_0503@hotmail.com

Tutora:

Dra. Eugenia Peñaherrera Wilches

CI: 0102452075

Cuenca, Ecuador

07-octubre-2022

Resumen:

Los extractos vegetales son una fuente potencial de principios activos con actividad biológica; sin embargo pueden presentar toxicidad en concentraciones definidas, por ello, el presente trabajo de titulación se centró en determinar la toxicidad de dos extractos metanólico y etanólico de *Ruta graveolens* (Ruda) y *Phyllanthus anisolobus* (Barbasco) respectivamente, para lo cual se usó el ensayo de toxicidad en embriones de peces (del inglés FET) el cual tiene como organismo modelo al pez cebra (*Danio rerio*).

Las plantas mencionadas fueron seleccionadas en base a su toxicidad en estudios realizados dentro del “Grupo de Plantas Medicinales del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca”, como en la información bibliográfica, las cuales fueron recolectadas, caracterizadas botánicamente, lavadas, secadas y liofilizadas, con el fin de obtener los extractos secos. Por otra parte, para la realización del FET, como primer paso se procedió a la adecuación de las peceras siguiendo los lineamientos de Westfield y los descritos en el manual de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) con el fin de obtener un buen rendimiento en la puesta de huevos los cuales posteriormente fueron puestos en contacto con los extractos a diferentes concentraciones con el fin de encontrar toxicidad en base a la letalidad, misma que al ser observada en cada test sirvió para realizar el cálculo de la concentración letal 50 (del inglés LC50).

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente con el empleo del software GraphPad Prism 9.4.0 para el cálculo del LC50 de cada extracto, presentando el *Phyllanthus anisolobus* una LC50 de 2.44 y la *Ruta graveolens* una LC50 de 4.84 con lo cual se concluyó que ambos extractos presentan toxicidad a bajas concentraciones siendo el extracto etanólico del *Phyllanthus anisolobus* el que presentó un LC50 más bajo por ende una mayor toxicidad. A través del presente trabajo se logró optimizar el ensayo de toxicidad en embriones de peces cebra

dentro del laboratorio del Grupo de Plantas Medicinales, útil en futuras investigaciones para evaluación de toxicidad de extractos.

Palabras claves: Embriotoxicidad, Plantas medicinales, Danio rerio, FET.

Abstract:

The present project focused on determining the toxicity of two methanolic and ethanolic extracts of *Ruta graveolens* (Ruda) and *Phyllanthus anisolobus* (Barbasco) respectively, using fish embryo toxicity tests (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism.

The study began with the selection of two plants that have reported toxicity both in studies carried out within the "Plant Group of the Biosciences Department of Cuenca University" and in bibliographic information, which were collected, botanically characterized, washed, dried and concentrated to obtain the dry extracts. On the other hand, for the FET, as a first step, the fish tanks were adapted following the guidelines described in the OECD manual in order to obtain a good performance in egg laying, which were then put in contact with the extracts at different concentrations in order to find toxicity based on lethality, which was observed in each test and used to calculate the LC50.

The obtained results were analyzed statistically with the use of Microsoft Excel 2016-64 bits using a linear regression for the calculation of the LC50 of each extract, with which it was concluded that both extracts present toxicity at low concentrations, being the ethanolic extract of *Phyllanthus anisolobus* (Barbasco) the one that presented a lower LC50 and therefore presented a higher toxicity.

Keywords: Embryo toxicity, medicinal plants, *Danio rerio*, FET.

Índice

Introducción	14
CAPÍTULO I	16
1. Marco teórico	16
1.1. Importancia de extractos de plantas como formas farmacéuticas y de las pruebas de toxicidad	16
1.2. Especies vegetales en estudio	17
1.2.1. Ruda (<i>Ruta graveolens</i>)	18
1.2.2. Barbasco (<i>Phyllanthus anisolobus</i>)	19
1.3. Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	21
1.3.1. Generalidades del pez cebra	21
1.4. El pez cebra como modelo biológico	28
1.4.1. <i>Danio rerio</i> como organismo modelo en ensayos toxicológicos	29
1.4.2. Aspectos bioéticos en la experimentación animal	32
CAPÍTULO II	35
2. Materiales y métodos	35
2.1. Materiales	35
2.2. Metodología	36
2.2.1. Obtención de muestras vegetales	36
2.2.2. Procesamiento de muestras vegetales	36
2.2.3. Prueba de toxicidad en embriones de peces (FET)	37
2.2.4. Análisis estadístico	41
CAPÍTULO III	43
3. Resultados y discusión	43
3.1. Adecuación de la pecera	43
3.2. Validez del test toxicológico	44
3.3. Pruebas de toxicidad	45
3.4. Concentración letal media (LC50)	49
CAPÍTULO IV	53
4. Conclusiones y Recomendaciones	53
4.1. Conclusiones	53

- 4.2. **Recomendaciones**53
- 5. **Bibliografía**55
- 6. **Anexos**.....60

Cláusula de Propiedad Intelectual

Esteisy Paulina Peralta Córdova autora del trabajo de titulación " Optimización del modelo de pez cebra (*Danio rerio*) para toxicidad de extractos vegetales", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 7 de octubre 2022



Esteisy Paulina Peralta Córdova

C.I: 1105333486

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Esteisy Paulina Peralta Córdova en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Optimización del modelo de pez cebra (*Danio rerio*) para toxicidad de extractos vegetales”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 7 de octubre 2022



Esteisy Paulina Peralta Córdova

C.I: 1105333486

Cláusula de Propiedad Intelectual

Edisson Homero Bravo Barbecho autor del trabajo de titulación " Optimización del modelo de pez cebra (*Danio rerio*) para toxicidad de extractos vegetales", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 7 de octubre 2022



Edisson Homero Bravo Barbecho

C.I: 0105719652

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Edisson Homero Bravo Barbecho en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Optimización del modelo de pez cebra (*Danio rerio*) para toxicidad de extractos vegetales”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 7 de octubre 2022



Edisson Homero Bravo Barbecho

C.I: 0105719652

Dedicatoria

Este Proyecto de titulación lo dedico a mis queridos padres Iván y Pilar, por su apoyo incondicional, con mucho amor, paciencia y sacrificio, fueron un pilar fundamental durante este periodo de formación profesional.

A mis hermanos Karina e Iván por estar a mi lado desde siempre.

A mi tía Lastenia, por su acogida, su solidaridad y su apoyo para alcanzar esta meta tan importante en mi vida.

A mis abuelitos, mis ángeles en el cielo:

Papi Beto mi fortaleza, quien me vio y me ayudo a crecer, con su cariño y ejemplo me enseñó a luchar para lograr mis objetivos de triunfar y cumplir mis sueños.

Mami Fani una mujer amorosa, cariñosa, paciente, fuerte y consentidora, crecí a su lado y ha hecho de mí una mujer capaz de alcanzar cualquier meta que me proponga por más difícil e inalcanzable que sea.

A toda mi familia, a mis tíos Ruth, Manuel y Rosa; a mis entrañables abuelitos Papi Bete (†) y Mami Nol, por sus consejos sabios y oportunos, que con empatía y cariño me ayudaron a seguir adelante, y me han ayudado para convertirme en una excelente profesional.

Esteisy Peralta Córdova.

Dedicatoria

Dedico este trabajo de titulación a Dios, por ser quien ha guiado mi vida siempre y ha permitido la realización de esta meta tan anhelada.

A mi abuelito Luis que siempre me dio su apoyo y desde el cielo sé que aún continúa haciéndolo.

A mis padres Susana y José y mis hermanos Maribel y Paúl quienes siempre me han apoyado y han estado para mí en los buenos y malos momentos, esto es por y para ustedes.

A mis tías Celia, Clotilde, Martha, María, a mi tío Vinicio y mis primos Esteban, Belén, Alex y Doménica que siempre han estado para mí en todo momento y de igual manera a Rodrigo quien me ha ayudado a lo largo de este proceso.

A mi querida Nathaly, que con su cariño y apoyo ha sido parte importante en la realización de esta meta y a mi amado hijo (moshi) que será de ahora en adelante el motivo por el cual superarme cada día.

Edisson Bravo Barbecho.

Agradecimientos

A Dios por permitirnos ingresar a la Universidad de Cuenca, que nos proporcionó los conocimientos necesarios para alcanzar nuestra meta en la carrera de Bioquímica y Farmacia.

Expresamos nuestra gratitud a todas aquellas personas que de una u otra manera han colaborado para culminar nuestro proyecto de titulación, y que han hecho lo posible su realización:

A la Doctora Eugenia Peñaherrera Wilches nuestra tutora, excelente profesional, por su incondicional apoyo, paciencia, dedicación y conocimiento brindado como guía durante el desarrollo de nuestro proyecto.

Al PhD. Fabián León Tamariz nuestro asesor, quien día tras día estuvo pendiente de nuestro trabajo y con su aporte profesional nos impulsó a sacar adelante este proyecto.

A la B.Q.F. Jessica Calle y B.Q.F. Salome Zea nuestras asesoras, quienes con gran profesionalismo, carisma y conocimiento supieron orientarnos en cada uno de los pasos realizados para culminar con éxito nuestro trabajo de titulación.

Introducción

La prueba de toxicidad aguda mediante el uso de modelos animales implica la utilización de invertebrados como el camarón de salmuera hasta mamíferos superiores como ratones, ratas, cobayos y conejos. Todos ellos conforman una parte fundamental para la evaluación e identificación de los principales efectos de sustancias de diferente uso, de entre ellos farmacológico, sobre las estructuras, órganos o sistemas de los animales. Las pruebas de toxicidad en modelos animales tienen la ventaja de que éstos presentan una estrecha relación con la toxicidad humana, especialmente si se usa el pez cebra, que tiene una analogía genética del 87% con el ser humano, aunque existen diferencias anatómicas y fisiológicas importantes, la mayoría de los órganos del pez cebra realizan las mismas funciones que sus contrapartes humanas y exhiben una fisiología bien conservada (Jayasinghe & Jayawardena, 2019).

La OECD, es una organización que regula en materia de ciencia y tecnología, los ensayos biológicos de diferente índole, que realizan los grupos de investigación o aplicación profesional alrededor del mundo. Uno de estos ensayos es el test de toxicidad aguda en pez cebra, FET el mismo que, si bien es cierto, está descrito en el documento 236 de la OECD, es preciso adaptar la técnica a cada uno de los laboratorios de experimentación y demostrar la validez del mismo con la línea de peces cebra que se dispone con el fin de optimizar la técnica según parámetros y equipamiento local. En este contexto, las pruebas de toxicidad de extractos de plantas medicinales son muy importantes, ya que, al ser potencialmente una fuente de principios activos con actividad farmacológica, es preciso tener un acercamiento al “daño” que podría ocasionar dicho extracto en un organismo vivo como el pez. Autores como (Lammer et al., 2009) (Alafiatayo et al., 2019), (Huang et al., 2018) y (Nguyen et al., 2020) han utilizado este método y se ha obtenido excelentes resultados. Por otro lado, es importante mencionar que para llevar a cabo la validación fue necesario disponer del modelo de *Danio rerio* en condiciones óptimas, así como probar con extractos de plantas que han sido ya reportadas como tóxicas, tales como *Ruta graveolens* (ruda) y *Phyllanthus anisolobus* (barbasco), las

mismas que sirvieron para optimizar la técnica, pues se necesitaron concentraciones muy bajas para observar su efecto sobre el desarrollo de huevos de tres horas hasta 96 horas post-fertilización.

Por lo expuesto, el objetivo general del presente trabajo fue optimizar el ensayo de toxicidad básico para extractos vegetales utilizando como modelo los embriones pez cebra (*Danio rerio*). Los objetivos específicos fueron: a.) establecer las condiciones de cultivo y crecimiento adecuadas para generar embriones viables para el modelo; b.) evaluar la toxicidad de dos extractos vegetales en un ensayo optimizado; y, c.) demostrar la validez del ensayo dentro del laboratorio del Grupo de Plantas Medicinales del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca para futuras aplicaciones.

CAPÍTULO I

1. Marco teórico

1.1. Importancia de extractos de plantas como formas farmacéuticas y de las pruebas de toxicidad

Una nueva categoría terapéutica que ha revolucionado los esquemas tradicionales de tratamiento a fines del siglo XX ha sido el uso de fitomedicamentos, estableciendo un valioso aporte a la ciencia. Al existir plantas con un elevado potencial terapéutico que han sido utilizadas como un tratamiento alternativo se ha visto la importancia de realizar estudios preclínicos con la finalidad de detectar, a más de la actividad biológica de importancia, efectos tóxicos post administración de los mismos (Bermúdez et. al, 2007).

A lo largo de los años se ha subestimado el uso de la medicina tradicional por parte de los servicios de salud, no obstante se ha utilizado para mantener la salud y prevenir enfermedades; es así que la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que un porcentaje elevado de la población mundial, hace uso de plantas medicinales para solventar sus necesidades médicas primarias; además, la aparición de cierto tipo de enfermedades, sumado a los problemas de acceso de varios sectores de la población a los servicios de salud, son factores que han contribuido a motivar el interés en este tema por parte de todos los organismos de salud (Quiroga, Arrázola, & Tórrez, 2009). Sin embargo, es importante destacar que los componentes de ciertos extractos vegetales poseen sustancias químicas cuya ingesta puede resultar altamente tóxica e incluso letal. Hoy en día, pese a la implementación y el desarrollo de sistemas de vigilancia toxicológica, la intoxicación por vía oral por sustancias vegetales sigue siendo una causa evitable de morbimortalidad (Martínez et al., 2014).

El estudio de la toxicidad de los principios activos provenientes de los extractos vegetales requiere, entre otros, el uso de modelos animales para la determinación de actividades farmacológicas (Peñaherrera et al., 2016). Dentro del grupo de ensayos de primera línea se encuentran los estudios de toxicidad a dosis única

imprescindibles en la estimación del potencial tóxico, referido como el estudio cuali-cuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas (Bermúdez et al., 2007). De allí radica la importancia de realizar el presente trabajo de investigación.

Los métodos de estandarización deben tomar en consideración todos los aspectos que contribuyen a la calidad de las hierbas medicinales, a saber: identidad correcta de la muestra, evaluación organoléptica, evaluación farmacológica, materia volátil, evaluación cuantitativa (valores de cenizas, valores extractivos), evaluación fitoquímica, prueba de la presencia de xenobióticos, pruebas de carga microbiana, pruebas de toxicidad y actividad biológica. De estos, el perfil fitoquímico es de especial importancia ya que tiene una relación directa con la actividad de las hierbas medicinales. Además, es necesario generar perfiles fitoquímicos y adoptar una estrategia de estandarización basada en marcadores para minimizar la variación de lote a lote, para mantener la calidad y garantizar la seguridad y eficacia (Folashade, Omoregie, & Ochogu, 2012).

Por otro lado en el Ecuador, existen ciertas áreas con rica biodiversidad como la región oriental o amazónica pero la escasa información acerca de muchas especies vegetales nativas en relación a sus propiedades medicinales, hace obligatoria la realización de estudios preliminares tanto de características fitoquímicas como toxicológicas, estas podrían tener efectos terapéuticos frente a varias enfermedades, de ahí se vuelve fundamental en la medicina a base de plantas la evaluación toxicológica para identificar los efectos adversos y proteger a los seres humanos de sus potenciales efectos nocivos (Navas et al., 2020).

1.2. Especies vegetales en estudio

Posterior a revisión bibliográfica de especies vegetales, se optó por usar dos plantas: Ruda (*Ruta graveolens*) y Barbasco (*Phyllanthus anisolobus*), las cuales son plantas con antecedentes de toxicidad reportados. Al analizar los perfiles fitoquímicos se encontró que las hojas de Ruda contienen diversas sustancias químicas tóxicas: alcaloides, glucósidos y taninos; por otro lado, la presencia del

flavonoide rotenona confiere al Barbasco su potencial toxico, mayormente en insectos y peces (Cáceres, 2006; Castellanos, 2014).

1.2.1. Ruda (*Ruta graveolens*)

A continuación, se observa en la figura 1 la planta de *Ruta graveolens* que fue usada para la obtención del extracto.



Figura 1. *Ruta graveolens*.

En la Tabla 1 se resume la descripción botánica y farmacológica de *Ruta graveolens*.

Tabla 1. Descripción botánica y farmacológica.
(Nahar et al., 2021, Badhusa et al., 2020)

Nombre científico	<i>Ruta graveolens</i>
Nombre común	Ruda
Familia	<i>Rutaceae</i>
Descripción botánica	Posee tallos herbáceos de dos a tres pies de alto y ramificados, son pequeñas, carnosas, lisas y apareadas sobre un pecíolo, terminadas por una hoja impar. Su raíz es leñosa, fibrosa y amarillenta. La flor está compuesta por cinco pétalos cóncavos y el cáliz está dividido en cinco

	partes; sin embargo, en su mayoría constan de cuatro pétalos y cuatro divisiones en el cáliz. Por otro lado, el pistilo viene acompañado de 8 a 10 estambres, adheridos al cáliz. Finalmente, el fruto es una cápsula dividida en lóbulos como pétalos que se abren por la parte superior.
Composición	Está constituido por aceite esencial que contiene sesquiterpenos en su mayoría. En total la planta contiene 0,2- 0,7% de aceite esencial; y su composición fitoquímica es a base de cetonas, alcaloides, flavonoides, alcoholes e hidrocarburos
Usos tradicionales	Es usada para amenorrea, dolores menstruales, reumatismo, neuralgias, fiebre, cefaleas, luxaciones e inflamaciones por su acción analgésica, a pesar de ello también es usada con fines abortivos, nerviosismo, histerias e inapetencia.
Partes usadas	Se usó la parte aérea (hojas y flores).

1.2.2. Barbasco (*Phyllanthus anisolobus*)

A continuación, se observa en la figura 2 la planta de *Phyllanthus anisolobus* que fue usada para la obtención del extracto.

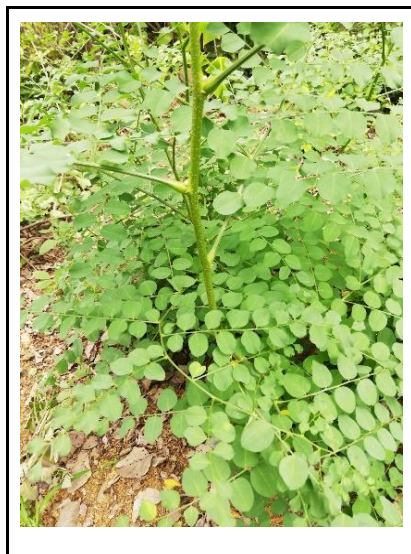


Figura 2. *Phyllanthus anisolobus*.

En la Tabla 2 se resume la descripción botánica y farmacológica de *Phyllanthus anisolobus*.

Tabla 2. Descripción botánica y farmacológica.
(De la Torre et al., 2008, Gentry, 1996)

Nombre científico	<i>Phyllanthus anisolobus</i>
Nombre común	Barbasco
Familia	<i>Phyllanthaceae</i>
Descripción botánica	Son hierbas, arbustos o pequeños árboles que no contienen látex, sus hojas son alternas simples con margen entero y su disposición es en un solo plano dando la impresión de una hoja compuesta. Tiene flores verdes apétalas que salen de la axila de cada hoja, y sus frutos son redondos divididos en tres partes.
Composición	Los compuestos que hacen a los barbascos ictiotóxicos son sus metabolitos secundarios, entre ellos el isoflavonoide rotenona, que se caracteriza por ser muy tóxica para los peces e insectos (ectotermos) y mucho menos activa en los mamíferos y aves (endotermos).
Usos tradicionales	Como ictiotóxico, para ello se debe moler las hojas y colocarlas en el río y algunos metros más adelante se pueden recoger los peces muertos o paralizados. Las hojas también son usadas en el ámbito medicina, se machaca las hojas y se las coloca en las muelas para sacarlas sin dolor, otro uso que le dan es para eliminar granos y manchas de la piel. Por otra parte, tiene una acción insecticida, se lo usa para controlar plagas de insectos.
Partes usadas	Se usó raíz, tallo y hojas.

1.3. Pez cebra (*Danio rerio*)

1.3.1. Generalidades del pez cebra

1.3.1.1. Taxonomía

El pez cebra de nombre científico, *Danio rerio*, es un pequeño pez ovíparo teleósteo de agua dulce perteneciente a la Familia *Cyprinidae*, Orden *Cypriniformes*, Clase *Actinopterygii*, Superclase *Osteichthyes*. Mide alrededor de 2-4 cm, es una especie originaria del sudeste asiático y su rango de distribución natural incluye las cuencas del río Ganges, Brahmaputra y las aguas dulces tropicales de las regiones monzónicas de la India, Bangladesh, Nepal, Bután y el norte de Myanmar (Espinoza, 2016).

Sin embargo, es común hallarlo en acuarios de todo el mundo, esto implica que su adquisición es relativamente fácil y debido a que tiene una alta capacidad de reproducción, el riesgo de extinción es bajo. Este pez se ha utilizado ampliamente para el desarrollo genético, la transgénesis y los estudios toxicológicos, por lo cual se ha convertido en un modelo popular para la investigación debido a la alta conservación de la función genética entre el pez cebra y los humanos (Vargas, 2017).

1.3.1.2. Características del organismo modelo y mantenimiento

Para obtener una correcta condición de reproducción de los peces cebra, se los debe alimentar con una variedad de alimentos, como los gránulos de trucha secos o húmedos molidos manualmente, o incluso alimento seco a manera de escamas. Se debe colocar una cantidad suficiente de comida en cada pecera ya que lo que se espera es que todos los peces tengan algo de alimento, el consumo de la misma no debe sobrepasar los cinco minutos, por lo general se alimenta dos veces al día a los peces adultos, pero se debe considerar que alimentaciones ligeras y múltiples brindan a los peces una buena oportunidad de utilizar la comida. Conforme las revisiones bibliográficas realizadas se ha encontrado que el mejor alimento es el camarón de salmuera que según (Westerfield, 2000) indica que es de fácil adquisición y se debe cumplir con un proceso para su preparación que consiste en agregar 10 ml de huevos de camarones a 2000 ml de agua salada, airear

vigorosamente y después de 48 horas a 28,5 °C, filtrar los camarones a través de un paño, lavar con agua dulce y diluir en agua destilada en una proporción de 1 volumen de camarones por 3 volúmenes de agua, y la proporción para su alimentación corresponde a una pipeta Pasteur de camarones diluidos por 8 peces adultos.

Por otra parte, las *Dafnias* y las larvas de *Drosophila* son otros posibles alimentos a diferencia del camarón de salmuera, aquí se tiene que tener especial cuidado con los gusanos tubifex porque pueden transmitir enfermedades. Por otro lado (Westerfield, 2000) menciona que es importante considerar un programa de cría de pez cebra para obtener una máxima producción de embriones mismo que consiste en lo siguiente:

- **Días sin cría:**
 - **Al amanecer:** alimentar con comida seca/húmeda y camarones de salmuera
 - **Mediodía:** alimentar con comida en escamas
 - **Hora 13:** alimentar con comida en escamas, sifonar el tanque para eliminar los residuos y reemplazar 1/3 del agua.
- **Día anterior a la cría:**
 - **Al amanecer:** alimentar con pasta de hígado y camarón de salmuera
 - **Mediodía:** alimentar en escamas
 - **Hora 13:** dar comida en escamas, sifonar el tanque para eliminar los restos y reemplazar 1/3 del agua, añadir machos y canicas al tanque de las hembras
- **Día de la cría:**
 - **Amanecer:** sifonar el tanque para los embriones, retirar los machos y las canicas del tanque de cría.
 - **Hora 2:** alimentar con comida seca/húmeda y camarón de salmuera
 - **Mediodía:** dar comida en escamas.
 - **Hora 13:** alimentar con comida en escamas, sifonar el tanque para eliminar los residuos y reemplazar 1/3 del agua. Luego cada 10 días se debe transferir todos los peces a tanques limpios.

Otro punto importante de mencionar es el agua ya que se considera fundamental para el mantenimiento de los peces, y se puede usar varios tipos de agua. Por ejemplo, los peces adultos se pueden mantener en agua del grifo, acondicionados dejándolos reposar, pero se debe tener en cuenta la calidad de la fuente de agua local y de las demandas para la producción de embriones, porque si se trata de agua de mala calidad afectará negativamente a la salud de los peces incrementando su susceptibilidad a las enfermedades y disminuyendo su potencial de reproducción. En caso de dudar de la calidad de agua se tiene como mejor opción indudablemente usar el agua desionizada o destilada añadiendo una pequeña cantidad de sales y minerales. Por otro lado, los embriones y larvas jóvenes tienen requisitos más estrictos y deben criarse en medio embrionario (Westerfield, 2000).

En cuanto a la reproducción, este pez es fotoperiódico y produce embriones todas las mañanas, poco después del amanecer. Para obtener una producción continua de un número relativamente pequeño de embriones (30-50 por pecera y por día), se recomienda usar un número igual de machos (más largos, más delgados y más amarillos, especialmente en el vientre) y hembras (más gordas y más plateadas). También es necesario controlar el ciclo día-noche con un temporizador automático (14 horas de luz/10 horas de oscuridad). Mantener a los peces bien alimentados con un rico suministro de alimentos es fundamental para su reproducción, se debe evitar interrumpir los ciclos de luz de los peces y siempre se debe tener controlada la temperatura para ello se usa calefactores o termostatos con la finalidad de mantener una óptima temperatura dentro de las peceras, por último, se tiene que cubrir todo el fondo del tanque con una sola capa de canicas para evitar que los peces se coman los huevos recién desovados (Westerfield, 2000).

1.3.1.3. Desarrollo del organismo modelo

El ciclo de vida del pez cebra inicia cuando la hembra realiza la deposición de sus huevos en el agua donde el macho los fecundará posteriormente. Las etapas de desarrollo embrionario se dan de una manera muy rápida; en horas (hpf) o días (dpf)

posteriores a la fecundación. Las hembras pueden depositar hasta más de 200 huevos en una semana los cuales luego de tres días eclosionarán. Dentro del laboratorio se los puede mantener en cajas de cultivo gracias a su reducido tamaño. A partir de los tres meses de vida, los peces pueden comenzar a reproducirse continuamente y a diferencia del hombre, el pez cebra continúa con su crecimiento hasta la muerte (Rojas-Muñoz, Bernad, Izpisúa, 2007).

Sus características biológicas han propiciado que se use como modelo animal en ciencias biomédicas desde los años 90, debido a su pequeño tamaño, corto ciclo de vida y su alta tasa de fecundidad, favoreciendo así su uso en laboratorio como organismo de prueba, ya que son reproductores grupales y dispersores de huevos, la ovulación de la hembra dependerá de la exposición de esta a las feromonas gonadales del macho y la presencia del mismo es primordial para que se de el desove. Es primordial saber que el desarrollo del pez cebra ocurre de forma muy rápida, y tiene una duración aproximada entre 2 y 4 días. Entre 48 y 72 horas post fecundación el desarrollo de la mayoría de órganos se completa, con excepción de los órganos que componen el tracto gastrointestinal. Posterior a esto, a las 76 hpf, el páncreas, el intestino y el hígado, completaran su desarrollo, y finalmente a las 96 hpf, tendrá el tracto gastrointestinal completamente desarrollado. Los especímenes juveniles del pez cebra presentarán la mayoría de características de los adultos; pero solo se los considerará adultos como tal a partir de los 3 meses cuando se haya alcanzado la madurez sexual (Espinoza, 2016).

Cabe destacar que existe una gran similitud genética entre el pez cebra y los humanos (87%) y aunque existen importantes diferencias anatómicas y fisiológicas, la mayoría órganos de este pez cumplen las mismas funciones que sus contrapartes humanas y exhiben también una fisiología bastante conservada (Jayasinghe & Jayawardena, 2019).

1.3.1.4. Periodos de desarrollo del pez cebra

A continuación, se describe textualmente lo que se indica en la descripción del desarrollo del pez cebra en el texto de (Westerfield, 2000):

- Periodo de cigoto:

Etapa comprendida entre 0 y 0,75 horas post-fertilización (hpf). Inicia con la fertilización del ovocito y finaliza con la primera escisión o división celular, 40 minutos luego de la fertilización aproximadamente (Westerfield, 2000).

- Periodo de escisión o corte:

Comprendido entre 0,75 y 2,25 hpf. Posterior a la primera escisión, las células se dividen rápida y sincrónicamente a intervalos de 15 minutos aproximadamente, comenzando con la etapa de 2 células y terminando en la etapa de 64 células (Westerfield, 2000).

- Período de blástula:

Periodo comprendido entre las 2,25 y 5,25 hpf. Es un período en el cual el blastodisco empieza a verse similar a una bola en la etapa de 128 células o también conocido como el octavo ciclo celular cigótico. Importantes procesos celulares se desarrollan en esta etapa, entre los cuales tenemos, la transición de la mitad de la blástula, la formación de la capa sincitial de la yema y el inicio de la epibolia (Westerfield, 2000).

- Periodo de gástrula:

Periodo comprendido entre las 5,25 y 10 hpf. En este periodo la epibolia continua y se producen los movimientos morfo genéticos celulares de involución, convergencia y extensión, lo cual da origen a las tres capas germinales primarias y los ejes embrionarios. En esta etapa también se desarrolla un sistema nervioso central muy rudimentario al formarse la placa neural. El periodo de gástrula finaliza al completarse la epibolia (Westerfield, 2000).

- **Periodo de segmentación:**

Comprendido entre las 10 y 24 hpf. Se desarrollan los somites, se observa un desarrollo rudimentario de los órganos primarios, aparece la cola y se da el alargamiento del embrión. En la etapa final de este período las primeras células terminan su diferenciación morfológica y comienzan los movimientos corporales (Westerfield, 2000).

- **Periodo de faríngrula:**

Periodo comprendido entre las 24 y 48 hpf. El embrión se ha desarrollado hasta la etapa filotípica; este período lleva su nombre por la formación de los siete arcos faríngricos, los dos primeros dan lugar a la mandíbula, y los cinco posteriores forman las branquias. El embrión ha enderezado el eje de su cuerpo, tiene bien desarrollado el SNC (sistema nervioso central), el cerebro muestra todas las subdivisiones principales (cinco lóbulos), se da el inicio de la pigmentación, las aletas comienzan su desarrollo, el corazón empieza a latir al inicio del periodo y se ha completado la somitogénesis (Westerfield, 2000).

- **Periodo de eclosión:**

Periodo comprendido entre las 48 y 72 hpf. Se ha completado casi en su totalidad la morfogénesis de los órganos rudimentarios y en la mayoría de estos se da una ralentización considerable a excepción del intestino y órganos asociados. Se desarrolla la mandíbula (en el último periodo de la eclosión), los arcos branquiales y las aletas pectorales. La eclosión se da de manera asincrónica durante todo el tercer día del desarrollo y en ocasiones puede darse en un tiempo más prolongado (Westerfield, 2000).

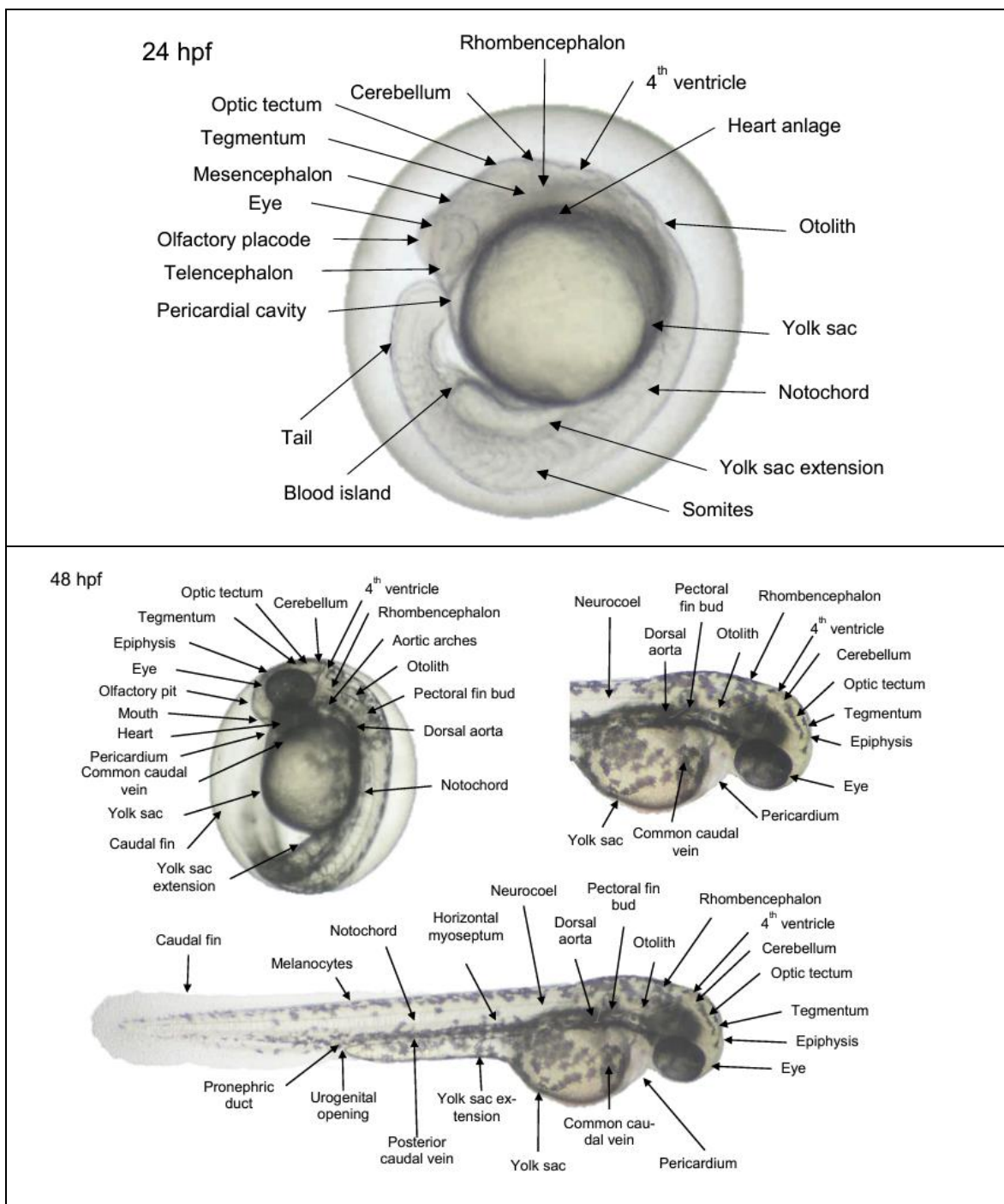
- **Periodo de larva temprana:**

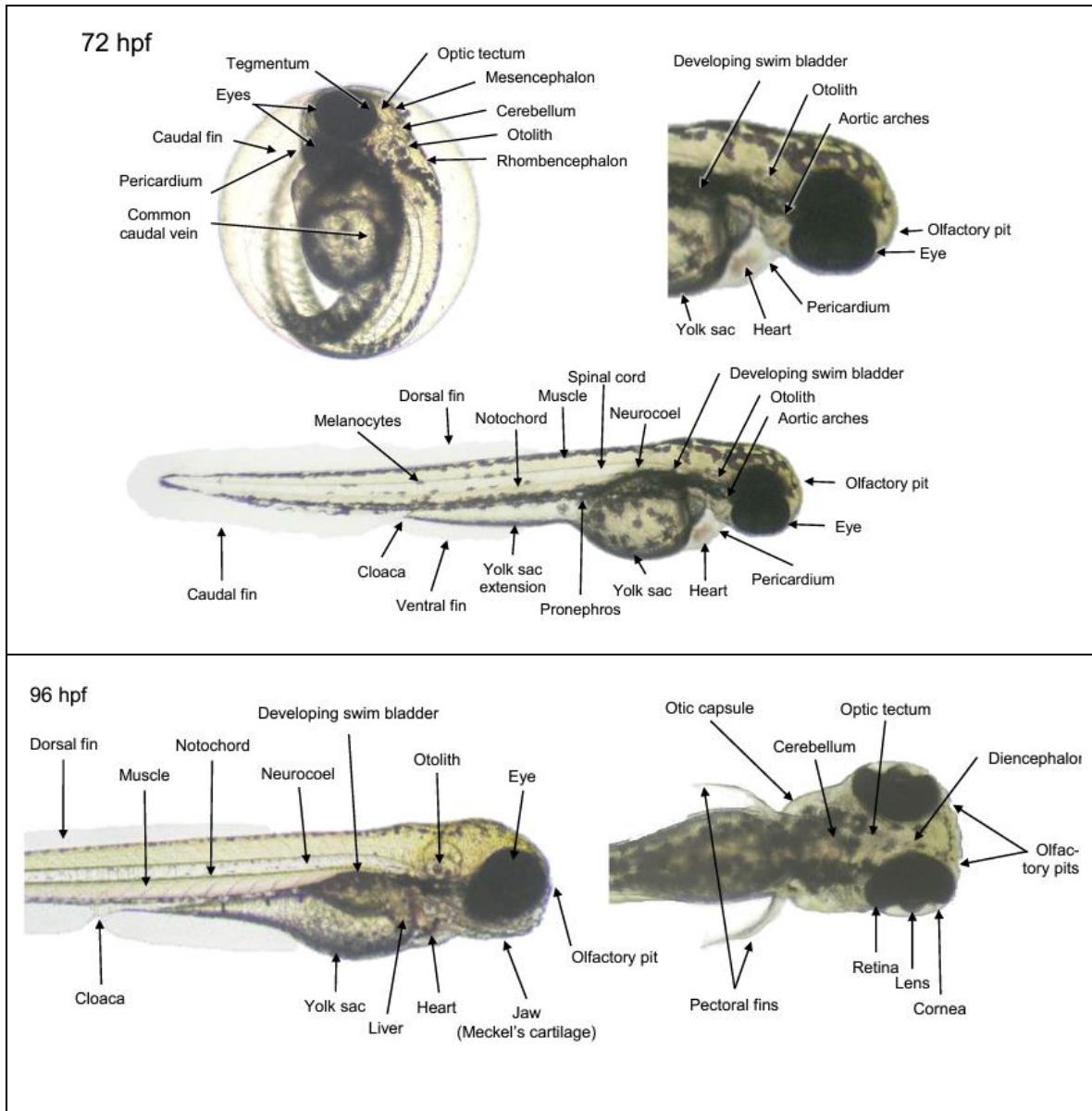
Periodo comprendido entre 72 hpf y 7 dpf (días post-fertilización). Se completa la morfogénesis y se da un aumento de tamaño muy marcado. La boca se observa bien abierta y se nota como esta sobresale anteriormente más allá de los ojos. La

aleta pectoral continúa su expansión, la vejiga natatoria se infla y se observan comportamientos de evitación activa y búsqueda de alimento (Westerfield, 2000).

Fig. 3. Morfología normal de *Danio rerio* a las 24, 48, 72 y 96 hpf.

(Hellfeld et al., 2020)





1.4. El pez cebra como modelo biológico

El pez cebra es materia de investigación en varios laboratorios y por muchos investigadores alrededor del mundo. Desde la década de los 70 se propuso el empleo de este pez para complejos estudios biológicos centrados en el desarrollo y el sistema nervioso, así como también ha sido utilizado en varios estudios para probar la toxicidad de fármacos, de extractos vegetales y también para la evaluación de la ecotoxicidad. Dentro de la identificación de nuevos fármacos, los embriones del pez cebra permiten agilizar el análisis de una gran colección de posibles

moléculas candidatas a convertirse en nuevos fármacos e identificarlas, facilitando así una de las fases más arduas del proceso de desarrollo de fármacos. Una ventaja adicional de este modelo, es que al realizar estos análisis en un sistema vivo, nos permite observar los efectos en todo el organismo, permitiendo así superar las limitaciones que presentan las pruebas celulares que generalmente no reúnen las condiciones “in vivo” y, por otra parte, el uso del pez cebra evita tener que recurrir a modelos que usan mamíferos en las fases tempranas del desarrollo de fármacos y adicional a esto, el bajo coste de mantenimiento y crianza resultan en beneficios económicos notables frente a los otros modelos animales (CSIC, s.f.).

Cabe destacar que *Danio rerio* es considerado un excelente instrumento para investigación ya que posee un origen remoto en común con el ser humano (hace 400 millones de años), es también muy económico de mantener en el laboratorio y puede ayudar en la reducción del uso de modelos de animales mamíferos en experimentación. Por su gran similitud genética, fisiológica y farmacológica con los humanos, es muy adecuado para la identificación de productos naturales bioactivos con gran potencial terapéutico. Este modelo in vivo es ideal y adecuado para el cribado fenotípico de rendimiento medio en placas de microtitulación, además con respecto a las pruebas de bioactividad de moléculas pequeñas, una ventaja clave de usar embriones y larvas de pez cebra es que los compuestos se pueden agregar simplemente al agua (no estéril) que los rodea, lo que aumenta aún más el rendimiento de la detección (Crawford, Esguerra y Witte, 2008).

1.4.1. *Danio rerio* como organismo modelo en ensayos toxicológicos

Las pruebas de letalidad o toxicidad aguda (determinación del LC50) nos permiten la evaluación de los principales efectos de las sustancias contaminantes que podrían actuar sobre la estructura de ciertos organismos o poblaciones acuáticas a un corto plazo (Bello, 2010).

En la mayoría de las investigaciones toxicológicas se emplea a los peces debido a que estos organismos vertebrados son considerados como buenos representantes

dada su mayor complejidad y por lo tanto los efectos tóxicos observados en ellos son más fáciles de comprender e interpretar, así como también es necesario garantizar siempre que el material de prueba tenga un origen común (Ramírez & Mendoza, 2008).

Cabe destacar que las pruebas de toxicidad aguda con vertebrados son una parte integral de la identificación de peligros ambientales y la evaluación de riesgos de productos químicos, productos fitosanitarios, fármacos, biocidas, aditivos alimentarios y efluentes (Braunbeck et al., 2014).

La tasa de terapias farmacéuticas innovadoras que llegan a los pacientes parece estar disminuyendo, es así que la cantidad de entidades moleculares enviadas a la FDA se ha reducido a la mitad aproximadamente desde 1997. En un reciente informe, la FDA señala a la deficiencia tecnológica en toxicología como la principal causa de este problema, y se ha visto que, en la mayoría de casos, modelos animales usados en el siglo pasado aún continúan usándose para la evaluación de la toxicidad de ciertas moléculas. Es así que surge la necesidad de nuevos modelos animales para probar la seguridad de los fármacos, sin embargo, se necesita progresar aún más en el desarrollo de mejores modelos animales para la evaluación toxicológica e involucrarla mucho antes en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos (Zon & Peterson, 2005).

El pez cebra ha ganado rápidamente una gran aceptación como modelo animal prometedor para la toxicología. La capacidad que brinda de evaluar de forma eficaz la toxicidad de gran número de compuestos permite preseleccionar bibliotecas completas para el análisis de su posible toxicidad. Cabe destacar que, los estudios toxicológicos realizados en el pez cebra requieren cantidades de compuestos solo en el rango de miligramos o microgramos, lo que lo diferencia de los ensayos en mamíferos los cuales con frecuencia requieren de unos cuantos gramos a cientos de gramos de un compuesto a analizar (Zon & Peterson, 2005).

El uso del pez cebra como material en experimentación permite, además de la identificación de nuevos fármacos, la observación y análisis de los efectos de los mismos y sus posibles productos tóxicos en todo el organismo. Por dichas razones, en los campos de la farmacología, la toxicología y la ecotoxicología, esta especie se plantea como un paso intermedio eficaz dentro del proceso de desarrollo de fármacos y como un excelente sistema para la detección de los efectos toxicológicos tanto de productos de nueva síntesis como de contaminantes ambientales (CSIC, s.f.).

Los adultos y los embriones de pez cebra son organismos usados popularmente como modelos de laboratorio; por lo general para las evaluaciones toxicológicas se utiliza al pez en sus etapas embrionarias debido a la naturaleza transparente del huevo, ya que permite observar las etapas de desarrollo del mismo y validar la toxicidad ya sea en extractos vegetales, fármacos, aditivos alimenticios, etc. (Jayasinghe & Jayawardena, 2019).

Todas las ventajas del embrión de pez cebra antes mencionadas son aprovechadas en el ensayo de toxicidad aguda en embriones de peces (FET). El FET ha sido aplicado satisfactoriamente a una gran variedad de sustancias que tienen diversos mecanismos de acción, volatilidades, solubilidades e hidrofobicidades (OECD,2013).

El uso del FET en pruebas de toxicidad presenta varias ventajas frente a modelos que impliquen el uso de animales superiores como ya se ha mencionado, la principal ventaja que presenta el FET frente a estos modelos de experimentación animal es que al estar en etapa embrionaria y por la falta de alimentación independiente no existe una ley que proteja ni regule su uso en experimentación, es así que el ensayo con embriones de pez cebra según la norma OECD 236 es considerada un experimento sin animales lo cual facilita su uso en los laboratorios al no ir en contra de las normas éticas que regulan la experimentación con animales superiores (Braunbeck et al., 2014).

Otra gran ventaja que presenta el FET es su gran aplicabilidad en estudios en diversas ramas de la ciencia, así por ejemplo tenemos que, el FET es utilizado en:

Toxicidad y ecotoxicidad: las pruebas de toxicidad aguda en peces es un requisito obligatorio en el conjunto de pruebas de ecotoxicidad y dado que se ha planteado la hipótesis de que los peces usados en dichas pruebas sufren dolor y angustia el uso de los mismos presentan una incompatibilidad con la mayoría de legislaciones sobre el bienestar animal, es por ello que el uso de los embriones de pez cebra a sido en pruebas de toxicidad ha sido una alternativa muy útil para reemplazar el uso de peces adultos en dichas pruebas (Lammer et al., 2009).

Neurotoxicidad y trastornos cardiovasculares: dado que los sistemas nervioso y cardiovascular del pez cebra presentan una gran similitud tanto anatómica como fisiológica comparada con los mamíferos (incluido el ser humano), los ensayos realizados usando el FET se han convertido en un poderoso modelo animal para la investigación de toxicidad del sistema nervioso y cardiaco, esto debido a su facilidad de mantenimiento, su manipulabilidad genética y su capacidad de cribado de alto rendimiento y sumado a esto, los recientes avances en las técnicas de imagen y la generación de peces cebra transgénicos han facilitado el análisis in vivo de los procesos celulares del desarrollo y la patogénesis tanto del sistema nervioso como cardiovasculares. Incluso la aplicación de este modelo nos permitiría identificar ciertos compuestos de la medicina herbaria con posibles efectos cardiovasculares beneficiosos (Seto et al., 2015)

1.4.2. Aspectos bioéticos en la experimentación animal

Visto desde el punto bioético, se considera que los animales al no poseer autonomía, no pueden negarse a participar en experimentos y, por lo tanto, la responsabilidad recae en los humanos para no causarles daños innecesarios, siendo obligación del investigador aumentar su bienestar y mantener condiciones estables a los animales de estudio, todo esto con el fin de obtener resultados fiables y reducir el número de experimentos necesarios, disminuyendo así el número de animales a usar, que es el objetivo fundamental. Conviene precisar que en la experimentación animal no se da una total separación entre humanos y animales;

al contrario, el hecho de utilizar a ciertos animales como biomodelos de los humanos, se justifica dadas las semejanzas biofisiológicas que comparten (Amador & Morón, 2010).

Según Osorio (2006) menciona que en el pasado se sacrificaban animales en grandes cantidades, pero en la actualidad esto ha cambiado, y estas prácticas han disminuido, modificando significativamente la situación y trato a los animales en las últimas décadas, esta disminución viene dada por el principio de las 3 R de Russel (reemplazo, reducción y refinamiento). Russel y Burch definieron alternativas como cualquier técnica que reemplace el uso de animales, reduzca su número en un trabajo particular o que mejore un método ya existente para lograr disminuir el dolor o el malestar de dichos animales. Por ello las alternativas de reducción describen métodos para obtener niveles comparables de información, a partir del uso de un número mínimo de animales en los procedimientos científicos, por otro lado, en los métodos de laboratorio la reutilización o refinamiento, consiste en que, aquellos animales que no hayan sufrido daños severos en anteriores procesos y sean viables para nuevos experimentos, sean incluidos nuevamente, evitando comprar y en consecuencia, afectar a un mayor número de animales, también agrupan aquellos métodos que alivian o minimizan el dolor potencial y la angustia para mantener el bienestar de los animales.

A pesar de que los animales parecen tener menos autoconciencia que los humanos, ellos también padecen dolor, pena, nostalgia, alegría y exhiben características individuales, por tanto, no cabe pensar que un auténtico espíritu científico se deleite al cometer aberrantes crueldades con los animales, ya que son muchos los organismos usados para este tipo de evaluaciones, entre los de prueba encontramos desde invertebrados como el camarón de salmuera hasta mamíferos superiores como ratones, ratas, cobayas y conejos. Un tema que sigue causando controversia es el referente a las consideraciones éticas acerca del uso de animales. Es importante mencionar que años atrás los animales no eran considerados como seres sintientes, por ende no existía restricción ante el número de animales que se

requería para estudios de experimentación, la única preocupación era la parte económica, ya sea para la adquisición de los animales necesarios para los diferentes estudios científicos, su mantenimiento o para la elección de nuevas técnicas de evaluación, es decir, modelos no animales o técnicas mucho más refinadas o avanzadas con la finalidad de acabar con el sufrimiento de los mismos (CONICYT, 2009).

Hoy en día, el uso de animales de experimentación tiene que ser revisada y autorizada por un comité de bioética, ya que existe una obligación moral y legal de causar el menor sufrimiento posible, es decir, salvaguardar su bienestar; sin embargo, existen excepciones cuando no hay otra alternativa, misma que debe ser explicada y justificada científicamente. Por otro lado, como ya se ha mencionado anteriormente un requisito de vital importancia es el bienestar animal, mismo que permite validar a los resultados experimentales como confiables, este tema forma parte de un debate continuo entre científicos y filósofos por el uso de los modelos animales para resolver problemas terapéuticos, de diagnóstico de enfermedades humanas, y la imposición del ser humano como especie para tratar a los animales como medios, no como fines (Molina et al., 2015).

CAPÍTULO II

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Equipos	<ul style="list-style-type: none">- Horno de secado PRO 3 (Cuenca, Ecuador)- Destilador de agua FANEM (Sao Paulo, Brasil)- Balanza analítica BOECO (Alemania)- Balanza analítica METTLER TOLEDO (Suiza)- Baño ultrasónico COLE-PARMER (Illinois, Estados Unidos)- Rotavapor HEIDOLPH LABOROTA 4000 Efficient de Heidolph (Schwabach, Alemania)- Liofilizador FreeZone 2.5 LABCONCO (Kansas, Estados Unidos)- Recirculador de agua VWR (Estado Unidos)- Baño maría ultrasónico BRANSON 2510R-DTH (Danbury, Estados Unidos)- Biofreezer FISHER SCIENTIFIC ISOTEMP (Massachusetts, Estados Unidos)- Estereomicroscopio trinocular SZX2-ILLT (Tokio, Japón)- Estufa bacteriológica MEMMERT-ALEM (Schwabach, Alemania)- Vortex Mixer 120V LABNET (Estados Unidos)- Potenciómetro multiparámetros ORION 5 STAR THERMO SCIENTIFIC (Indonesia)- Purificador de agua BARNSTEAD RO (Dubuque, Estados Unidos)
Reactivos	<ul style="list-style-type: none">- Medio embrionario Danieau's 0.3X- DMSO (dimetilsulfóxido) Merck (Darmstadt, Alemania)- Nitrógeno gaseoso Vidasua (Cuenca, Ecuador)
Solventes	<ul style="list-style-type: none">- Etanol Merck (Darmstadt, Alemania)- Metanol Merck (Darmstadt, Alemania)

2.2. Metodología

2.2.1. Obtención de muestras vegetales

La muestra vegetal de *Ruta graveolens* fue obtenida en el mercado 10 de agosto de la ciudad de Cuenca y las muestras de *Phyllanthus anisolobus* fueron obtenidos por recolección en las provincias de Loja y Cañar.

2.2.2. Procesamiento de muestras vegetales

2.2.2.1. Área de recolección de las muestras vegetales

En la tabla 3 se especifica los datos de recolección de cada planta utilizada para los ensayos toxicológicos:

Tabla 3. Datos de recolección de muestras vegetales.

Especie	Fecha de recolección	Coordenadas UTM WGS 84		Lugar de recolección
		X	Y	
Ruda	16-03-2022	-	-	Comprado en el mercado 10 de agosto de la ciudad de Cuenca
Barbasco	13-03-2022	9539277	604556	Parroquia Teniente Maximiliano Rodríguez (Celica), sector Tishangara, junto al camino.
Barbasco	13-03-2022	9736845	689990	Provincia de Cañar, Cantón la Troncal, recinto Nueva Unión, junto al riachuelo.

2.2.2.2. Recolección, selección y lavado y secado

La recolección se realizó manualmente en fundas de papel con la finalidad de no dañar la especie. En el laboratorio se realizó la selección de las partes a usar, en la Ruda (*Ruta graveolens*) toda la parte aérea de la planta es decir tanto las hojas como las flores, por otro lado, en el Barbasco (*Phyllanthus anisolobus*) se seleccionaron las hojas. Se lavó con agua destilada y se secó en el horno de secado PRO 3 (Cuenca, Ecuador), para el posterior triturado de la droga.

2.2.2.3. Percolación

Para iniciar este proceso primero se humectó la droga, para ello se pesó 10 gramos y se la humectó con el solvente correspondiente en este caso se usó metanol Merck (Darmstadt, Alemania) para la Ruda (*Ruta graveolens*) y etanol Merck (Darmstadt, Alemania) para el Barbasco (*Phyllanthus anisolobus*), es importante mencionar que la droga debe quedar cubierta con papel aluminio y bajo oscuridad, esto se realizó aproximadamente de 15 a 18 horas. Posteriormente, se transfirió la droga ya humectada a los correspondientes percoladores, sobre ella se vertió los solventes respectivos, mismos que estarán 1 cm por encima de la droga y se dejó macerar por 24 horas con la llave del percolador cerrada. Completadas las 24 horas de maceración se procedió a la recolección: primero se recogió la fracción 1 que corresponde al 75% del primer tubo y luego se dejó un goteo constante (20 gotas por minuto) durante 8 horas (Anexo 1). Finalizado todo este tiempo se concentró los extractos con nitrógeno Vidasua (Cuenca, Ecuador), (hasta obtener aproximadamente 1 cm del tubo) (Anexo 2).

2.2.2.4. Liofilización y almacenamiento

Obtenidos los extractos concentrados con nitrógeno se procedió a la liofilización por 24 horas, culminado el tiempo se consiguió el extracto seco que fue transferido a tubos tapa rosca para su posterior almacenamiento en el Biofreezer Fisher Scientific Isotemp (Massachusetts, Estados Unidos) a -20°C (Anexo 4).

2.2.3. Prueba de toxicidad en embriones de peces (FET)

2.2.3.1. Acondicionamiento de la pecera

Para iniciar el acondicionamiento se lavó la pecera y se preparó el agua con sales según lo indicado en el PNT previamente establecido en el laboratorio de peces. Luego se llenó la pecera y el filtro se colocó previamente armado según instrucciones del fabricante, se sembró Bio Nitrivec realizando los cálculos previos dependiendo del volumen de agua de la pecera; teniendo en cuenta que para la siembra de este serán necesarios 10 ml por cada 25 litros de agua. Se tuvo que esperar la maduración del filtro y verificar la misma mediante parámetros físico

químicos. Las condiciones de cultivo y crecimiento para generar embriones viables del modelo de pez cebra (*Danio rerio*), según Westerfield (2000) son:

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos.

Parámetros físico químicos	Rango
Diarios	
pH	6.8-7.5 tolera desde 6 hasta 8.5
Conductividad	300 - 1000 μ S/cm
Oxígeno disuelto	6 mg/L
Temperatura	26-28.5°C tolera desde 22 hasta 30°C
Semanales	
Amonio	< 0,02 mg/L
Nitritos	< 0,1 mg/L
Nitratos	< 50 mg/L
Dureza total (GH)	~ 50-100 mg/L CaCO ₃ (~2-6° GH*)
Dureza de carbonatos (KH)	~ 50-100 mg/L CaCO ₃ (~2-6° GH*)
Ciclo luz/oscuridad	14/10 horas

Para concluir con este punto se realizó la recolección y selección de huevos, como se describe a continuación: se debe colocar las trampas al finalizar el día, al día siguiente, retirar la trampa de la pecera luego de una hora de encendidas las luces de acuerdo al ciclo luz/ oscuridad, colocar en un recipiente plástico adecuado y posterior a este paso se coloca los huevos en un cernidor que no permita el paso de los mismos a través de él. Enjuagar la caja Petri de la trampa con el agua de la pecera y posteriormente enjuagar los huevos utilizando una piseta que contenga medio embrionario Danieau's, con la finalidad de eliminar las impurezas, previo a esto se debe tener lista una caja Petri con medio embrionario y cuidadosamente pasar los huevos del cernidor a la caja. Trasladar la caja al estereomicroscopio y seleccionar los huevos viables, separando de los huevos defectuosos (desarrollo anormal, coagulados, no viables, corion roto), por último, se debe contabilizar los huevos viables y no viables para realizar el cálculo de porcentaje de rendimiento,

etiquetar y devolver la caja Petri a la cabina para mantener la temperatura adecuada para su posterior desarrollo (Anexo 6).

2.2.3.2. Ensayo de toxicidad en el modelo de pez cebra

Preparación de los extractos para ensayo de toxicidad en embriones FET

Se inició con la preparación de una solución stock con una concentración de 250 mg/mL con DMSO (100% DMSO). Partiendo del stock se preparó soluciones de las siguientes concentraciones: 25; 12.5; 6.25; 3.125; 1.562 y 0.7812 µg/mL, utilizando como solvente el medio embrionario Danieau's. Se ajustó el porcentaje del solvente para que cada dilución contenga DMSO al 0,01%.

Ensayo de toxicidad en embriones de pez cebra FET

Los ensayos se realizaron con el fin de demostrar la toxicidad de extractos vegetales de *Ruta graveolens* y *Phyllanthus anisolobus* en embriones de pez cebra tratados a las 3 hpf, se usó un sistema estático en el cual las concentraciones de las soluciones de ensayo permanecen inalteradas durante toda la duración del mismo. El procedimiento a continuación descrito consta en el PNT 2 (Anexo 7) que se basa en las directrices del documento 236 de la OECD.

Se colocó en cada pocillo de la placa (24 pocillos) un huevo preseleccionado en el estereomicroscopio, posterior a la colocación de los huevos se procedió a retirar con sumo cuidado el exceso de medio Danieau's y se distribuyó 2 mL de cada solución de prueba (1-5), control negativo (nC), control positivo (pC), control del solvente (sC) y el control interno de la placa (iC), como se indica en la Figura 4. Una vez se haya puesto en contacto con todas las soluciones se procedió a dejar en incubación en la cabina de peces cebra para mantener las condiciones óptimas de luz/oscuridad y temperatura. El ensayo se realizó por triplicado repitiendo el mismo procedimiento en cada uno.

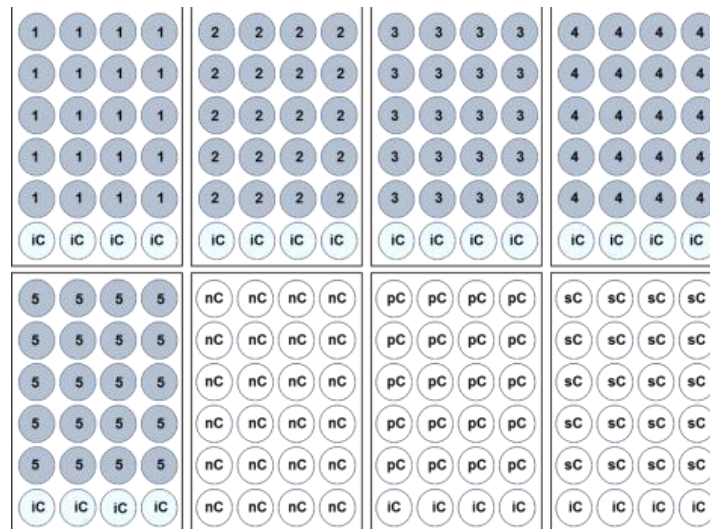


Figura 4. Disposición de placas de 24 pocillos (OECD,2013).

1-5 = Concentraciones de prueba; nC = control negativo (medio embrionario);
 iC = control interno de la placa (agua de dilución); pC = control positivo
 (DMSO 5%); sC = control del solvente (DMSO 0,01%)

Observación de resultados

Se realizaron las observaciones de los resultados a las 24, 48, 72 y 96 horas pocillo por pocillo con ayuda del estereomicroscopio y se anotó todos aquellos que presentaron alguna de las observaciones apicales que indiquen toxicidad tal como está indicado en la Tabla 5.

Tabla 5. Criterios de valoración.

(Lammer et al., 2009), (Alafiatayo et al., 2019).

Criterios de valoración de letalidad	Tiempo de exposición			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Coagulación	•	•	•	•
No desprendimiento de la cola		•	•	•
No formación de somitas		•	•	•
Ausencia de latido cardiaco		•	•	•
Falta de eclosión				•
Muerte		•	•	•

Criterios subletales de valoración del desarrollo.

Formación de somitas	•			
Desarrollo normal de los ojos	•	•	•	•
Movimientos espontáneos	•	•	•	•
Latido del corazón/circulación sanguínea		•	•	•
Pigmentación		•	•	•
Formación de edemas				

Criterios de valoración de teratogenicidad

Malformación de cola	•	•	•	•
Malformaciones de la columna	•	•	•	•
Deformación de la yema	•	•	•	•
Retraso general del crecimiento	•	•	•	•

2.2.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico tuvo como finalidad determinar la existencia de toxicidad de los extractos vegetales seleccionados (*Ruta graveolens* y *Phyllanthus anisolobus*). En este diseño experimental se consideró como unidad experimental al grupo de veinte embriones de 3 hpf por placa, los cuales fueron sometidos a diferentes concentraciones de extractos, control positivo (DMSO 5%), control negativo (Danieau's) y control de solvente (Danieau's/DMSO 0.01%). Como variables independientes se consideraron (día del experimento, temperatura y concentración del extracto) y las dependientes (observaciones apicales: coagulación del embrión, falta de formación de somitas, no desprendimiento de cola, falta de latido y deformidad de la cola). Para eliminar variaciones tanto del operador como del proceso, así como también la temperatura del ambiente y del agua, ciclo luz/oscuridad y el tiempo de duración de cada test fue necesario incluir en cada uno

UCUENCA

una placa de control negativo, control positivo y control de solvente. El análisis estadístico de los resultados obtenidos a las 96 horas de cada test se empleó el software GraphPad Prism 9.4.0. Los resultados se expresan en concentración letal 50. Para el cálculo del LC50 se inició con una prueba piloto en base a los datos previos del laboratorio del grupo plantas. Para garantizar la reproducibilidad se probó cada extracto por triplicado en días diferentes; luego, el promedio de los tres tests se utilizó para encontrar el LC50 utilizando una regresión lineal simple.

CAPÍTULO III

3. Resultados y discusión

3.1. Adecuación de la pecera

Según las directrices de la OECD en su documento 236, ítem 12 se especifican las condiciones del agua de la pecera y de los ensayos. En la tabla 6 se exponen los parámetros obtenidos luego de la adecuación de la pecera, y la puesta en marcha del proyecto:

Tabla 6. *Características de la calidad del agua en el mantenimiento de los peces.*

Días de los ensayos	pH	Temperatura °C	Conductividad $\mu\text{S/cm}$	RDO mg/L
1	7.54	26	356.5	6.05
2	7.67	26	467.8	6.01
3	7.39	27	457.9	6.03
4	7.78	26	366.2	6.09
5	7.50	27	434.6	6.01
6	7.73	25	423	6.04
Promedio (DE)	7.60 (0.14)	26.16 (0.75)	417.7 (46.55)	6.04 (0.02)

Como se observa en la tabla anterior, el promedio de las mediciones diarias de pH fue de 7.60 (0.14) que está dentro del rango de referencia tolerable, que va desde 6 hasta 8.5; la temperatura estuvo en un promedio de 26.16 es decir está dentro del rango que es de 26-28.5 °C; la conductividad arrojó un resultado de 417.7 $\mu\text{S/cm}$ la misma que también se encuentra dentro del rango recomendado de 300-1000 $\mu\text{S/cm}$ y, por último, el RDO de 6.04 mg/L que igualmente se encontró dentro del valor referencial de 6 mg/L. Todos los valores referenciales

mencionados se encuentran descritos por Westerfield (2000), y constan en el PNT 1 (Anexo 6).

3.2. Validez del test toxicológico

Este resultado constituye los criterios de viabilidad de los huevos que se obtienen de las condiciones de pecera indicadas anteriormente.

A continuación, en la Tabla 7, se presentan los resultados del porcentaje de fertilización, temperatura, porcentaje de supervivencia, porcentaje de mortalidad en el control positivo y porcentajes de eclosión tanto en el control negativo como en el control de solvente, según el criterio 8 del documento 236 (OECD).

Tabla 7. Resultados obtenidos en base a los criterios de validez de la OECD.

Parámetros Día	% de Fertilización	Registros de temperatura	% supervivencia en control negativo	% mortalidad en control positivo	% de eclosión	
					Control negativo	Control de solventes
RUDA						
1	86	26	91.66	100	91.66	80
2	79	26	91.66	100	91.66	100
3	86	26	95.83	100	95.83	100
%TOTAL	83.66	26	93.05	100	93.05	93.33
BARBASCO						
1	71	26	91.66	100	91.66	85
2	82	26	95.83	100	95.83	95
3	95	25,5	95.83	100	95.83	90
%TOTAL	82.66	25.83	94.44	100	94.44	90

Un parámetro adicional que se debe reportar dentro de los criterios de validez, es la concentración de oxígeno disuelto medido a las 96 horas de exposición en cada pocillo, pero este valor no pudo ser registrado puesto que no se contó con el equipamiento necesario.

En resumen, la validez del test toxicológico cumple con las condiciones establecidas en la guía de la OECD e indicadas en el Anexo 9.

En cuanto a la solubilidad podemos indicar que ambos extractos vegetales fueron insolubles en agua, por ello se usó dimetilsulfóxido (DMSO) para la correcta solubilización de los mismos, para corroborar esto se buscó en la bibliografía y nos menciona que el *Phyllanthus anisolobus* precisamente la rotenona es insoluble en agua según OIT & OMS (2020). Cabe mencionar que, en cada una de las concentraciones de prueba, se llegó a un porcentaje de DMSO de 0,01%. Como el solvente utilizado en las pruebas de FET es Danieau's/DMSO 0,01%, se introdujeron los controles de solvente, como lo indica la técnica.

3.3. Pruebas de toxicidad

Finalmente, en la prueba de toxicidad con cada uno de los extractos en las diferentes concentraciones se obtuvieron datos que corroboran la validez de la técnica. En las Tablas 8 y 9 se presenta un resumen de la letalidad en cada concentración para cada uno de los extractos.

Tabla 8. Porcentaje de letalidad registrado a 96 horas de extracto etanólico del Barbasco en las diferentes concentraciones de prueba

BARBASCO (*Phyllanthus anisolobus*)

Concentración (µg/mL)	Letalidad 1 (%)	Letalidad 2 (%)	Letalidad 3 (%)	% Total
25	100	100	100	100
12,5	100	100	100	100
6,25	100	100	100	100
3,125	90	75	80	81.66
1,5625	15	15	5	11.66
0,7812	5	10	0	5

Tabla 9. Porcentaje de letalidad registrado a 96 horas de extracto metanólico de *Ruda* en las diferentes concentraciones de prueba.

RUDA (*Ruta graveolens*)

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Letalidad 1 (%)	Letalidad 2 (%)	Letalidad 3 (%)	% Total
25	100	100	100	100
12,5	100	100	100	100
6,25	90	85	80	85
3,125	10	5	10	8.33
1,5625	5	0	5	3.33

Los embriones fueron seleccionados e incubados a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, con distintas concentraciones de los extractos vegetales a analizar (0.78 a $25 \mu\text{g/mL}$), se observó el desarrollo de los embriones a las 24, 48, 72 y 96 horas utilizando el estereomicroscopio en busca de cualquiera de las observaciones apicales que nos indiquen la existencia de toxicidad.

La exposición a las concentraciones tóxicas de ambos extractos a 12.5 y $25 \mu\text{g/mL}$ exhibieron coagulación del huevo y muerte en las primeras 24 horas tanto en el extracto de *Ruta graveolens* como en el de *Phyllanthus anisolobus* obteniéndose un 100% de letalidad.

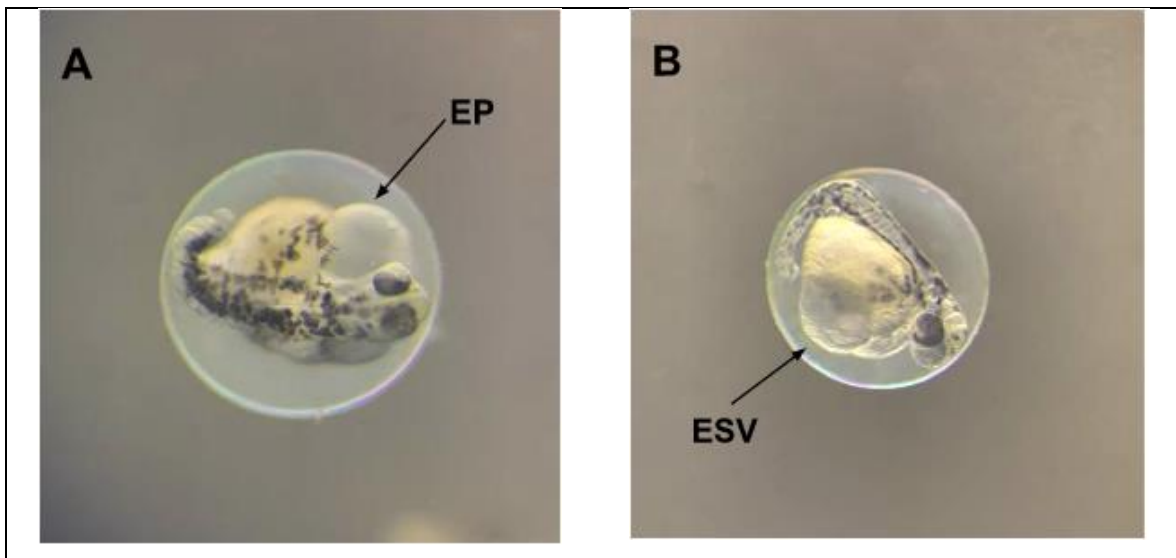
En el extracto de *Phyllanthus anisolobus* a las primeras 24 horas también se observó coagulación y muerte a la concentración de $6.25 \mu\text{g/mL}$ en un 100% y en la concentración de $3.125 \mu\text{g/mL}$ hubo retraso de eclosión a las 96 horas del test y se presentó una letalidad de un 81.66%, en $1.56 \mu\text{g/mL}$ se notó un bajo porcentaje de letalidad del 11.66% y por último el extracto de $0.78 \mu\text{g/mL}$ registró el porcentaje más bajo de letalidad de 5%.

En cuanto al extracto de *Ruta graveolens* en la concentración de 12.5 µg/mL se notó el no desprendimiento de la cola y un elevado porcentaje de muerte a las 48 horas, el mismo que alcanzó una mortalidad del 100% a las 72 horas, en 6.25 µg/mL se observó retraso de eclosión en todos los ensayos y una media de letalidad del 85% de muerte a las 96 horas, en 3.125 µg/mL se presentó una baja mortalidad con un porcentaje de 8.33% a las 24 horas y a 1.56 µg/mL los embriones se encontraban bien y la mortalidad fue mucho más baja con un porcentaje de 3.33 %. Cabe destacar que tanto los resultados registrados de letalidad a la concentración de 1.56 de *Ruta graveolens* como en 0.78 de *Phyllanthus anisolobus* podrían deberse a errores por parte del operador ya sea en el momento de la selección o al momento de la manipulación de los mismos en la preparación de los test.

La letalidad de los dos extractos vegetales sobre los embriones de pez cebra fueron muy notorios, mismos que se evidenciaron con la presencia de las características apicales de toxicidad mencionadas en la (Tabla 4), a más de esto se presencié teratogenicidad con el *Phyllanthus anisolobus*.

En definitiva los resultados obtenidos de análisis de las plantas (*Ruta graveolens* y *Phyllanthus anisolobus*) nos revelan que poseen una elevada toxicidad, que se podría atribuir al potencial tóxico propio de cada una de ellas y por ende al analizar el perfil fitoquímico basado en una revisión bibliográfica nos indica que según Cáceres (2006) las hojas de *Ruta graveolens* contienen diversas sustancias químicas consideradas perjudiciales o tóxicas entre ellas están: alcaloides, glucósidos y taninos, cabe recalcar que todo lo anteriormente expuesto es corroborado por Castellanos (2014) quien menciona que estas sustancias químicas, también se pueden encontrar en las flores y tallos. En cuanto al *Phyllanthus anisolobus* se encontró la presencia de varios flavonoides donde la rotenona es el compuesto más importante ya que tiene como característica ser el más tóxico, y se ha demostrado la toxicidad para insectos y peces, aunque está disminuye cuando se trata de aves y mamíferos (Gupta, 2012).

Además de lo expuesto, un resultado interesante obtenido en este proyecto fue observado en el extracto etanólico de *Phyllanthus anisolobus*, que demostró una gran actividad teratogénica observada a la concentración de 3.125 µg/mL. En dicha concentración se pudo notar edema pericárdico, saco vitelino agrandado, malformación de la cola la misma que en ocasiones se observó doblada o incluso no se formó, malformación de columna y retraso general de crecimiento (Figura 5), todas estas características se las observó desde las 24 horas pero se confirmó su presencia a partir de las 48 hasta las 96 horas de exposición al tóxico, es así que podemos comparar estos resultados con los reportados por Ismail et al. (2017), en el cual se determinó a la concentración teratogénica como la concentración a la cual se puede observar desarrollo anormal de órganos, columna doblada, saco vitelino agrandado, edema pericárdico, latidos cardíacos lentos y retraso en la eclosión (>72 hpf).



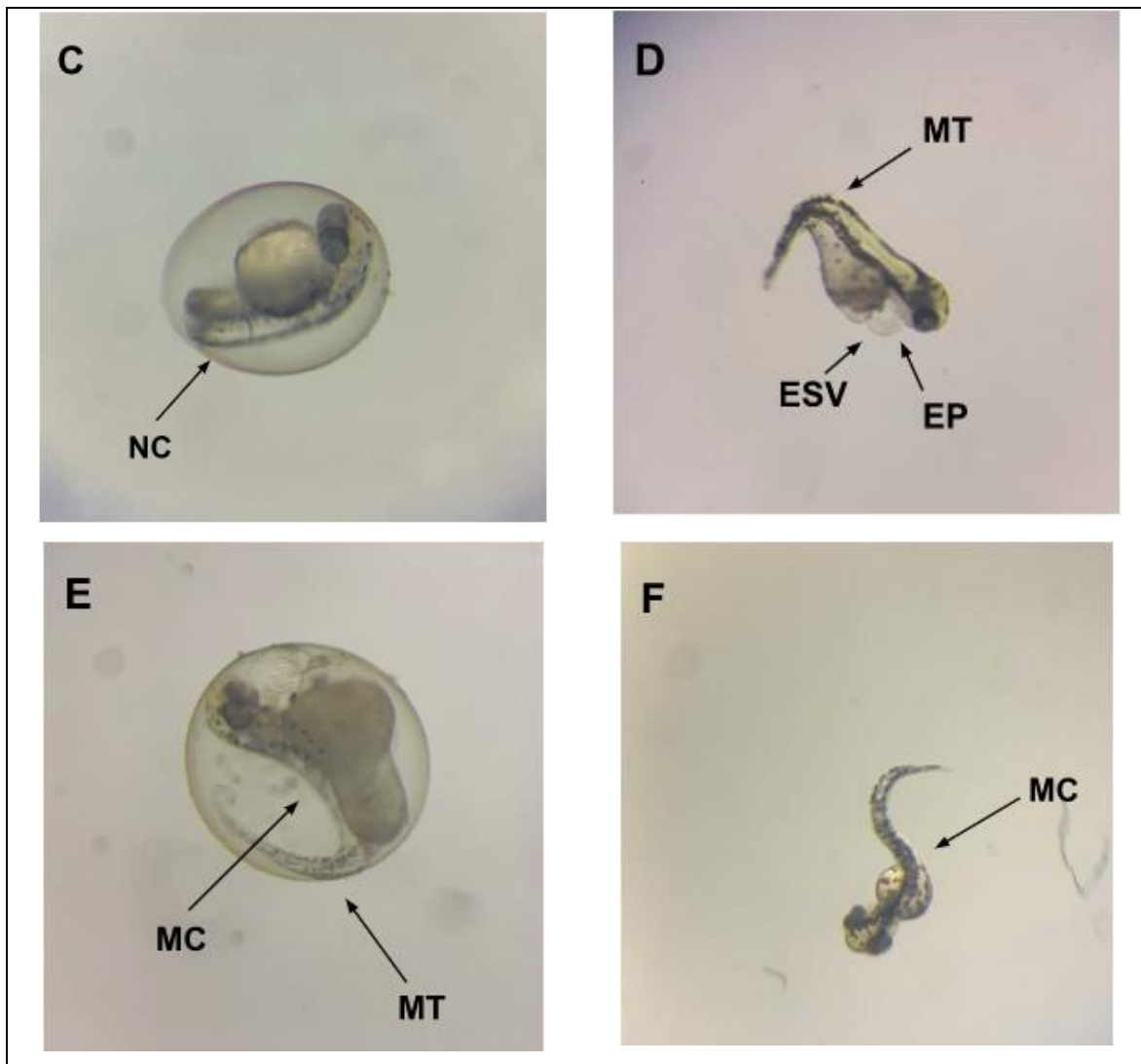


Figura 5. Características de teratogenicidad del Barbascó.

EP: edema pericárdico, **ESV:** edema saco vitelino, **NC:** no formación de cola, **MT:** malformación de cola, **MC:** malformación de columna.

3.4. Concentración letal media (LC50)

Por último, el cálculo de la concentración letal media (LC50) se analizó estadísticamente mediante el uso del software GraphPad Prism 9.4.0. y se reportó los resultados en la Tabla 10, seguido de los gráficos correspondientes a cada LC50 de cada planta.

Tabla 10. LC50 de extractos a 96 hpf de prueba FET.

Extracto	RUDA (<i>Ruta graveolens</i>)	BARBASCO (<i>Phyllanthus anisolobus</i>)
LC50 (µg/mL)	4.84	2.44
R ²	0.997	0.992

Se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

Gráfico 1. Cálculo de LC₅₀ para el extracto de *Ruta graveolens*.

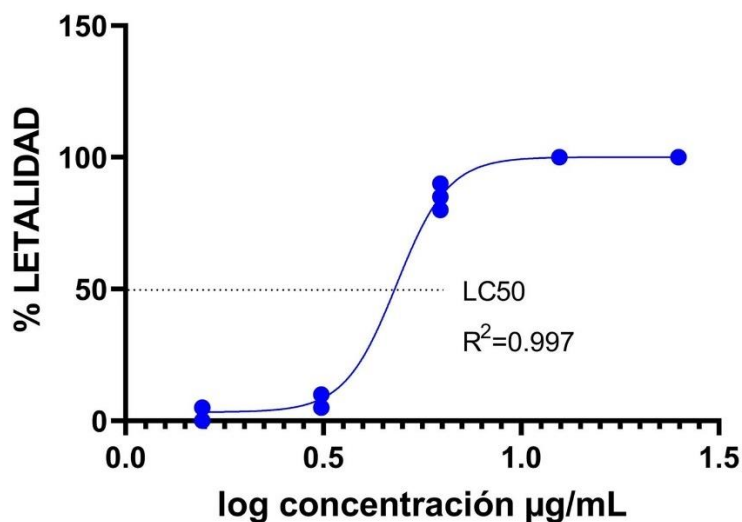
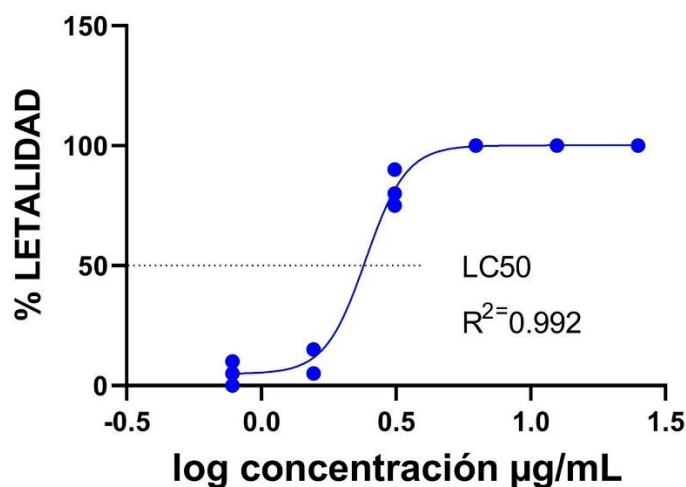


Gráfico 2. Cálculo de LC₅₀ para el extracto de *Phyllanthus anisolobus*.



Con referencia a los resultados de la Tabla 9 y los Gráficos 1 y 2, podemos evidenciar que la mayor toxicidad con un LC50 calculado de 2.44 µg/mL corresponde al extracto de *Phyllanthus anisolobus*, seguida del extracto de *Ruta graveolens* que presentó un LC50 calculado de 4.84 µg/mL.

Con los datos obtenidos, podemos observar que coinciden con lo reportado en investigaciones, tales como menciona Alafiatayo et al., (2019) al comparar 5 extractos metanólicos de *Cúrcuma longa* (125 µg/mL a 7.8 µg/mL) (DMSO 0.1%) y calcular el valor del LC50 a las 96 horas el cual fue de 56.677 µg/mL demostrando así la validez del empleo del FET para la determinación de la toxicidad de este extracto. Entre los efectos tóxicos evaluados en este ensayo se encuentran la coagulación de los huevos, la eclosión tardía y los latidos del corazón, mientras que las deformidades del desarrollo en las somitas, el desprendimiento de la cola, los otolitos, la circulación sanguínea, los latidos del corazón, la motilidad y la malformación esquelética evaluaron la teratogenicidad. Se evidenció además que en las dos concentraciones más altas (125 y 62.5) es donde mayor efecto embriotóxico se presentó concluyendo que la toxicidad y las deformidades son dependientes de la concentración y aumentan a medida que transcurren los días de exposición, además se observó a una concentración mayor de 62.5 µg/mL se registraron efectos teratogénicos en forma de deformidades en el desarrollo corporal después de 48 hpf.

Así también resultados similares son reportados en el estudio realizado por Fazry et al., (2018) en donde se realizó el estudio de dos componentes del pericarpio del mangostán: xantona cruda (XCE) y α-mangostin (α-MG), para la comprobación de su toxicidad en embriones de pez cebra. Se usó 5 concentraciones entre 250-7.81 µg/mL y 50-0.78 µg/mL respectivamente, en un lapso de 72 horas demostraron mortalidad del 100 % a una concentración de 62.5 µg/ml para XCE y de 50 µg/ml para α-MG en adelante. Adicionalmente, sus datos mostraron que los embriones supervivientes tratados con α-MG la concentración de 12,5 µg/mL o superiores presentaron una malformación de flexión de la cola, lo que indica que α-MG puede inhibir alguna expresión génica del desarrollo causando teratogenicidad.

Con lo expuesto podemos decir que los resultados obtenidos en los dos estudios mencionados tienen similitud con nuestros resultados, logrando corroborar la validez del FET para demostrar la toxicidad de los extractos vegetales probados a 5 concentraciones diferentes. Cabe destacar que cada ensayo, aunque tiene de base las directrices de la OECD cada autor ha optado por realizar diferentes cambios dependiendo de las necesidades de cada ensayo.

CAPITULO IV

4. Conclusiones y Recomendaciones

4.1. Conclusiones

El proyecto de integración curricular desarrollado pudo cumplir los objetivos planteados, concluyendo lo siguiente:

- Se obtuvieron las condiciones óptimas de cultivo y crecimiento para generar embriones viables de pez cebra (*Danio rerio*) para su posterior uso como modelo de toxicidad cuyas variables se indicaron en los resultados.
- Se pudo corroborar la validez del test de toxicidad dentro de los laboratorios del Grupo de Plantas Medicinales, ya que se obtuvieron huevos viables para el desarrollo del mismo.
- Se determinó la toxicidad en los dos extractos de *Ruta graveolens* y *Phyllanthus anisolobus* mediante el LC50 los cuales fueron de 4.84 µg/mL y 2.44 µg/mL respectivamente, observándose que el *Phyllanthus anisolobus* al presentar un valor más bajo del LC50 necesitaría concentraciones mucho menores para causar toxicidad, es decir este extracto es mucho más tóxico que el de *Ruta graveolens*, es por ello que esta planta debe contar con una vigilancia toxicológica ya que al ser ingerida puede ser perjudicial para la salud.
- El ensayo ha sido validado a través de la aplicación de la guía de la OECD y al contrastar con reportes de diferentes autores, se puede concluir que los ensayos realizados dentro de nuestro proyecto sirven para optimizar el modelo es decir sirven para reportar la toxicidad de extractos vegetales.

4.2. Recomendaciones

- Se deberían realizar más pruebas con otros extractos vegetales que contribuyan a la obtención una base de datos de toxicidad de extractos vegetales de plantas que se utilizan en la región, con lo que se podría realizar una comparación mucho más amplia.

UCUENCA

- Realizar procesos que permitan la identificación y aislamiento de los principios activos de los extractos, que podrían estar implicados en la toxicidad de las plantas usadas en este proyecto.
- Comparar estudios de toxicidad de extractos de plantas en diferentes modelos.

5. Bibliografía

1. Alafiatayo, A., Lai, K.-S., Syahida, A., Mahmood, M., & Shaharuddin, A. (2019). Phytochemical Evaluation, Embryotoxicity, and Teratogenic Effects of *Curcuma longa* Extract on Zebrafish (*Danio rerio*). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-10
2. Amador, M., & Morón, F. (2010). Bioética en experimentación animal para validar usos de plantas medicinales en el Laboratorio Central de Farmacología. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.*, 157-168.
3. Aranda, A., & Pastor, L. (2010). Ética de la experimentación con animales. *Revista Bioética y Ciencias de la Salud.*, 1-11.
4. Badhusha, S., Kumar, R., Ajay, A., Baby, B., Abhishek, K., Gowda, S., & Ramesh, B. (2020). Traditional uses, Phytochemistry and Ethnopharmacology of *Ruta graveolens* Linn: A review. *Revista Internacional de Farmacia y Análisis de drogas*, 1-4.
5. Bello, C. (2010). Cronotoxicidad del Cadmio en pez cebra: análisis de mortalidad y respuestas de comportamiento. Universidad de Murcia: Congreso Nacional de Medio Ambiente
6. Bermúdez, D., Monteagudo, E., Boffill, M., Díaz, L., Roca, A., Betancourt, E., & Silveira, E. (2007). Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria VIII*, 1-7.
7. Cáceres, A. (2006). *Vademecum Nacional de Plantas Medicinales*. Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC Ministerio de Salud Pública.
8. Castellanos, W. (2014). *Plantas Tóxicas*. Provincia de Tucumán: Ministerio de Salud Pública.

9. CONICYT. (2009). Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal. Chile: Comité Asesor de Bioética, FONDECYT-CONICYT.
10. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (s. f.). Seres modélicos entre la naturaleza y el laboratorio. Recuperado 5 de febrero de 2012, de <http://seresmodelicos.csic.es/peix.html>
11. Crawford, AD, Esguerra, CV y de Witte, PA (2008). Pesca de drogas en la naturaleza: el pez cebrá como plataforma tecnológica para el descubrimiento de productos naturales. *Planta médica*, 74 (06), 624-632.
12. De la Torre, L., Muriel, H. N., Macia, M., & Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. *Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus*. Quito.
13. Espinoza, M. (2016). El Pez Cebrá: una herramienta en educación. *Revista de Educación en Biología*, 11-18.
14. Fazry, S., Noordin, M.A.M, Sanusi, S., Noor, M.M., Aizat, W. M., Lazim, A. M., Dyari, H.R.E; Jamar, N.H.; Remali, J.; Othman, B.A.; Law, D.; Sidik, N.M.; Cheach, Y.H.; Lim, Y. C. (2018). Cytotoxicity and Toxicity Evaluation of Xanthone Crude Extract on Hypoxic Human Hepatocellular Carcinoma and Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Revista Toxics*, 2-10.
15. Folashade, K., Omoregie, E., & Ochogu, A. (2012). Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 101-112.
16. Gentry, A. H. (1996). A Field Guide to the Families and Genera of Woody Plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru). Chicago: The University of Chicago Press.
17. Gupta, R. C. (2012). Rotenone. *Veterinary Toxicology*, 620.

18. Hellfeld, R. v., Brotzmann, K., Baumann, L., Strecker, R., & Braunbeck, T. (2020). Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Sciences Europe*, 32-122.
19. Huang, D., Li, H., He, Q., Yuan, W., Chen, Z., & Yang, H. (2018). Developmental Toxicity of Diethylnitrosamine in Zebrafish Embryos/Juveniles Related to Excessive Oxidative Stress. *Water Air Soil Pollut*, 1-11.
20. Ismail, H. F., Hashim, Z., Soon, W. T., Rahman, N. S., Zainudin, A. N., & Majid, F. A. (2017). Comparative study of herbal plants on the phenolic and flavonoid content, antioxidant activities and toxicity on cells and zebrafish embryo. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 452-465.
21. Jayasinghe, C., & Jayawardena, U. (2019). Toxicity Assessment of Herbal Medicine Using Zebrafish Embryos: A Systematic Review. *HINDAWI*, 1-17.
22. Lammer, E., Carr, G., Wendler, K., Rawlings, J., Belanger, S., & Braunbeck, T. (2009). Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 196-209.
23. Martínez, A., Martínez, L., Margarit, A., Trenchs, V., & Luaces, C. (2014). Tóxicos vegetales: un problema aún vigente. *Anales de pediatría*, 347-353.
24. Molina, J., Alonso, G., Heredia, D., García, M., Sánchez, C., Castro, M., & Chaviano, L. (2015). Bioética en la Experimentación Animal. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 1-19
25. Nahar, L., El-Seedi, H., Khalifa, S., Mohammadhosseini, M., & Sarker, S. (2021). Ruta Essential Oils: Composition and Bioactivities. *Molecules*, 1-31.
26. Navas, V., Chiriboga, X., Miño, P., & Luzuriaga, C. (2020). Estudio fitoquímico y toxicológico de plantas nativas. *Revista Ciencia UNEMI*, 26-36.

27. Nguyen, T.-H., Nguyen, P.-D., Quetin-Leclercq, J., Muller, M., & Duong Thi Ly Huong, H. T. (2020). Developmental Toxicity of Clerodendrum cyrtophyllum Turcz Ethanol Extract in Zebrafish Embryo. *Journal of Ethnopharmacology*, 1-38.
28. Obaya, A., Ramo, J., Molina, M., Solís, V., Sparrowe, J., & Muñoz, C. (2018). Por qué los animales importan: argumentario sobre la experimentación animal. *Revista Animales de Laboratorio*, 17-24.
29. OECD. (2013). Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Obtenido de OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264203709en.pdf?expires=1657833856&id=id&ccname=guest&checksum=E01639413B4D6F2D406D811E95A6026F>
30. OIT, & OMS. (2020). Rotenona. Obtenido de Organización Internacional del Trabajo y la Organización mundial de la Salud: https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=es&p_card_id=0944&p_version=2
31. Osorio, A. M. (2006). Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. *Revista Colombiana de Bioética*, 163-183.
32. Peñaherrera, E., Jerves-Andrade, L., Cuzco, N., Wilches, I., León-Tamariz, F., & Tobar, V. (2016). Efecto antiinflamatorio de extractos metanólicos de plantas de Azuay y Loja (Ecuador) a través del modelo de Peces Cebra. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, (14), 1-12.
33. Quiroga, R., Arrázola, S., & Tórrez, E. (2009). Diversidad florística medicinal y usos locales en el pueblo Weenhayek de la Provincia Gran Chaco, Tarija, Bolivia. *REVISTA BOLIVIANA DE ECOLOGÍA Y CONSERVACIÓN AMBIENTAL*, 25-39.
34. Ramírez, P., & Mendoza, A. (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo*. México: Secretaría de Medio

Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). Obtenido de Ensayo de toxicidad aguda con larvas y juveniles de los peces *Brachydanio rerio* y *Poecilia reticulata*, 115-126

35. Rojas-Muñoz, A., Bernad, A., & Izpisúa, J. (2007). El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Revista Investigación y Ciencia*, 62-69
36. Seto, S.-W., Kiat, H., Lee, S. M., Bensoussan, A., Sun, Y.-T., Hoi, M. P., & Chang, D. (2015). Zebrafish models of cardiovascular diseases and. *European Journal of Pharmacology*, 1-27.
37. Vargas, R. (2017). Pez cebra (*Danio rerio*) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica. *Anestesia en México*, 86-96
38. Westerfield, M. (2000). *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.
39. Zon, LI y Peterson, RT (2005). Descubrimiento de fármacos in vivo en el pez cebra. *Reseñas de la naturaleza Drug discovery*, 4 (1), 35-44.

6. Anexos

Anexo 1. Percolación Ruda y Barbasco.



Anexo 2. Concentración del extracto con nitrógeno en baño ultrasónico



Anexo 3. Concentración de extractos vegetales en Rotavapor



Anexo 4. Liofilización de extractos.



Anexo 5. Obtención de extractos liofilizados.



Anexo 6. PNT N°1 “Condiciones de cultivo y crecimiento para generar embriones viables del modelo de pez cebra (*Danio rerio*)”

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO N°1

Tema: “Condiciones de cultivo y crecimiento para generar embriones viables del modelo de pez cebra (*Danio rerio*)”

1. Condiciones de mantenimiento de peces cebra

Según Westerfield (2000) en “*The Zebrafish Book/Page 1.10*” se mencionan los siguientes valores referenciales para los siguientes parámetros:

1. Temperatura in
2. Temperatura out
3. pH (6.8-7.5 tolera desde 6 hasta 8.5)
4. Conductividad (300 - 1000 $\mu\text{S/cm}$)
5. Oxígeno disuelto (6 mg/L)
6. Temperatura de la pecera (26-28.5°C tolera desde 22 hasta 30°C)
7. Amonio (< 0,02 mg/L)
8. Nitritos (< 0.1 mg/L)
9. Nitratos (< 50 mg/L)

10. Dureza total GH (~ 50-100 mg/L CaCO₃ (~2-6° GH*))
11. Dureza de carbonatos KH (~ 50-100 mg/L CaCO₃ (~2-6° GH*))
12. Ciclo luz/oscuridad (ciclo 14/10 horas)

2. Acondicionamiento de pecera

- a. Lavar la pecera según PNT N°ZG-2 establecido en el laboratorio de peces cebra del Grupo de Plantas Medicinales del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca, que corresponde al nombre de “Maduración de filtros para peceras de peces cebra”.
- b. Preparar el agua con sales según PNT N°PCOP 001 establecido en el laboratorio de peces cebra del Grupo de Plantas Medicinales del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca, que corresponde al nombre de “PNT para limpieza y cambio de agua de la pecera en el laboratorio de peces cebra”.
- c. Llenar la pecera y colocar el filtro, previamente armado según instrucciones del fabricante.
- d. Sembrar Bio Nitrivec realizando los cálculos previos dependiendo del volumen de agua de la pecera. Se debe sembrar 10 ml de Bio Nitrivec por cada 25 litros de agua.
- e. Esperar la maduración del filtro de la pecera.
- f. Verificar la maduración del filtro mediante parámetros físico químicos del punto 1.

3. Parámetros físico químicos a controlar

Los parámetros físico químicos a controlar diariamente son del 1 al 6 del punto 1 del presente PNT y los parámetros a controlar semanalmente son del 7 al 11 del punto 1 del presente PNT.

4. Recolección y calidad de huevos

- a. Colocar las trampas al finalizar el día alrededor de las 5pm.

- b. Al día siguiente, sacar la trampa de la pecera luego de una hora de encendidas las luces de acuerdo al ciclo luz/ oscuridad establecido en el punto 1 y colocar en un recipiente plástico adecuado.
- c. Colocar los huevos en un cernidor que no permita el paso de los mismos a través de él. Enjuagar la caja Petri de la trampa con el agua que salió de la pecera y posteriormente enjuagar los huevos utilizando una piseta que contenga medio Danieau's, con la finalidad de eliminar las impurezas.
- d. Colocar medio Danieau's en una caja Petri y cuidadosamente pasar los huevos del cernidor a la caja ayudándonos con más medio Danieau's.
- e. Trasladar la caja al estereomicroscopio para su observación y seleccionar los huevos viables, separando de los huevos defectuosos (desarrollo anormal, coagulados, no viables, corion roto, etc.).
- f. Se contabilizan los huevos viables y no viables para realizar el cálculo de porcentaje de rendimiento.
- g. Terminada la contabilización etiquetar y devolver las cajas Petri a la cabina con la finalidad de mantener la temperatura adecuada para su posterior desarrollo.

Anexo 7. PNT N°2 “Ensayo de Toxicidad FET (Fish Embryo Toxicity test)”

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO N°2

Tema: “Ensayo de Toxicidad FET (Fish Embryo Toxicity test)”

1. Consideraciones generales para la validez del test

Para que sean válidos los resultados del test, se deberán aplicar los siguientes criterios:

- a. Tasa de fertilización de todos los huevos recolectados ≥ 70 %.
- b. Temperatura del agua: entre 26 ± 1 °C en las cámaras de prueba en todo momento.

- c. Supervivencia global de los embriones en el control negativo $\geq 90 \%$ hasta el final de las 96 horas de exposición.
- d. La exposición al control positivo debe dar una mortalidad mínima del 30 % al final de las 96 horas de exposición.
- e. La tasa de eclosión en el control negativo será $\geq 80 \%$ al final de las 96 horas de exposición.
- f. Al final de las 96 horas de exposición, la concentración de oxígeno disuelto en el control negativo y la concentración de prueba más alta debe ser $\geq 80 \%$ de la saturación.

2. Descripción del FET (Fish Embryo Toxicity Test)

Mediante la técnica indicada en la guía de la OECD 236 (2013) el FET se inicia lo más pronto posible después de la fertilización de los huevos y finaliza después de 96 horas de exposición. Los embriones deben sumergirse en las soluciones de prueba en la etapa de 1k células (3 horas después de la fertilización). Se seleccionan los huevos fertilizados que experimentan escisión y que no muestran irregularidades obvias durante la escisión.

Para llevar a cabo la técnica del FET según la OECD se usará placas de 24 pocillos en las que se distribuirán las concentraciones de prueba (1-5), control negativo (nC), control positivo (pC), control del solvente (sC) y el control interno de la placa (ic), se debe recalcar que ic no se colocará en la placa correspondiente al control negativo como se indica en la (Fig. 1).

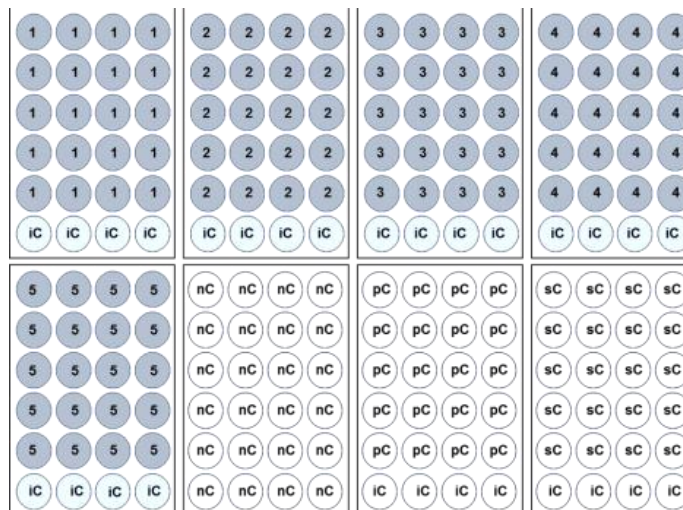


Figura 1. Disposición de placas de 24 pocillos (OECD,2013).
1-5 = Concentraciones de prueba; nC = control negativo (medio embrionario);
iC = control interno de la placa (agua de dilución); pC = control positivo
(DMSO 5%); sC = control del solvente (DMSO 0.01%)

3. Proceso

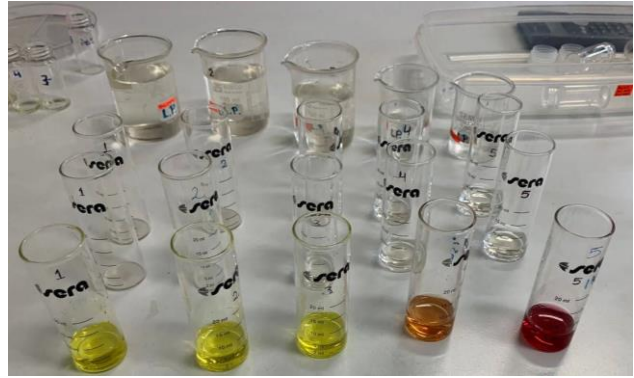
- a. Al día 0 seguir el procedimiento de recolección y calidad de huevos del PNT número 1 y mantenerlos en las condiciones requeridas para la validez del test (temperatura 26 ± 1 °C y medio embrionario).
- b. Preparar las soluciones de las concentraciones seleccionadas por dilución de una solución madre, esto se puede llevar a cabo mediante agitación o ultrasonificación, tener en cuenta que si la sustancia es difícil de disolver en agua se puede usar un solvente que ayude a su preparación, pero la concentración final no debe exceder los 100 µl/L (0.01%) y ser la misma en todas las soluciones de prueba. De ser necesario se requerirá un control de solvente adicional.
- c. Cumplidas las 3 horas post fertilización distribuir los huevos seleccionados en las cajas de 24 pocillos para las pruebas de toxicidad. Se colocará un huevo por pocillo, seguido de esto poner en contacto con las soluciones preparadas en el punto anterior, de acuerdo a lo indicado en la (Fig. 1).
- d. En cada pocillo colocar 2 ml de las soluciones de las concentraciones seleccionadas, controles interno, positivo y negativo. Finalmente observar en el estereomicroscopio a las 24, 48, 72 y 96 horas.

Nota. - Se realizarán 3 ensayos, teniendo en cuenta la guía de la OECD y modificaciones de los siguientes autores: (Lammer et al., 2009) (Alafiatayo et al., 2019), (Huang et al., 2018) y (Nguyen et al.,2020).

Tabla 1. Criterios de valoración

Criterios de valoración de letalidad	Tiempo de exposición			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Coagulación	•	•	•	•
No desprendimiento de la cola		•	•	•
No formación de somitas		•	•	•
Ausencia de latido cardiaco		•	•	•
Falta de eclosión				•
Muerte		•	•	•
Criterios subletales de valoración del desarrollo.				
Formación de somitas	•			
Desarrollo normal de los ojos	•	•	•	•
Movimientos espontáneos	•	•	•	•
Latido del corazón/circulación sanguínea		•	•	•
Pigmentación		•	•	•
Formación de edemas				
Criterios de valoración de teratogenicidad				
Malformación de cola	•	•	•	•
Malformaciones de la columna	•	•	•	•
Deformación de la yema	•	•	•	•
Retraso general del crecimiento	•	•	•	•



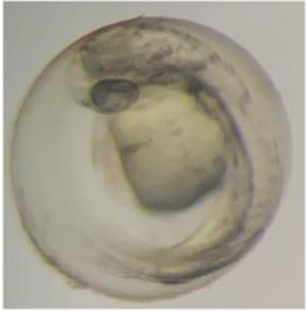

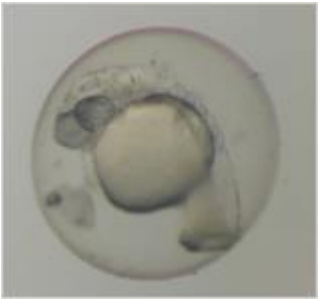
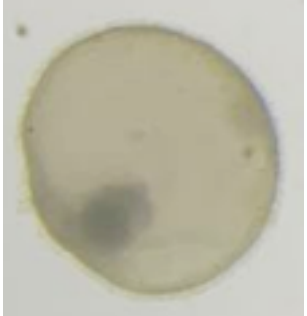

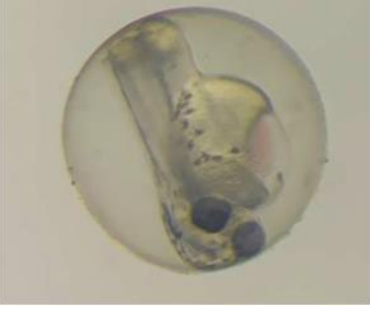

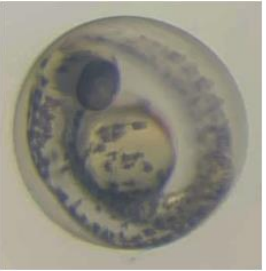
Anexo 8. Acondicionamiento de pecera y parámetros semanales.



Anexo 9. Criterios de validez de la OECD.

Parámetros Día	% de Fertilización	Registros de temperatura	% supervivencia en control negativo	% mortalidad en control positivo	% de eclosión	
					Control negativo	Control de solventes
	≥ 70%	26 ± 1 °C	≥ 90% a las 96 horas de exposición	Mínima mortalidad de 30% a las 96 horas de exposición.	≥ 80%	

Anexo 10. Resultados de las concentraciones en *Ruta graveolens* (Ruda)

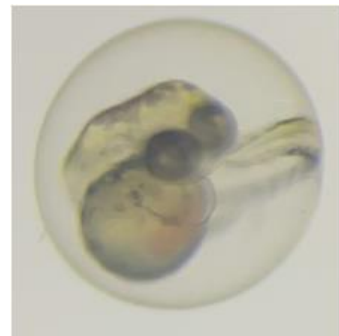
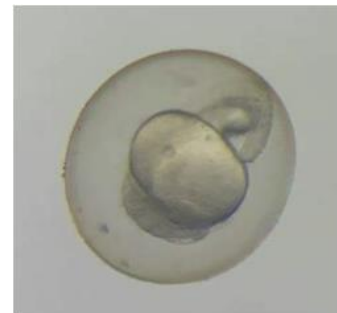
[C] Horas	25 ($\mu\text{g/mL}$)	12.5 ($\mu\text{g/mL}$)	6.25 ($\mu\text{g/mL}$)	3.125 ($\mu\text{g/mL}$)	1.5625 ($\mu\text{g/mL}$)
24					
48					

UCUENCA






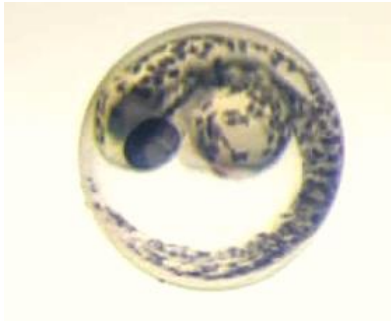
72



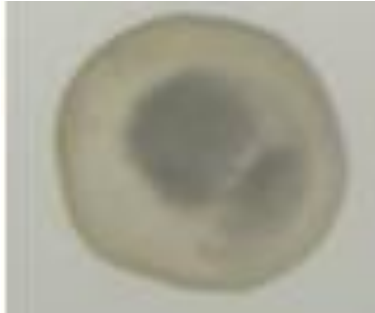
96



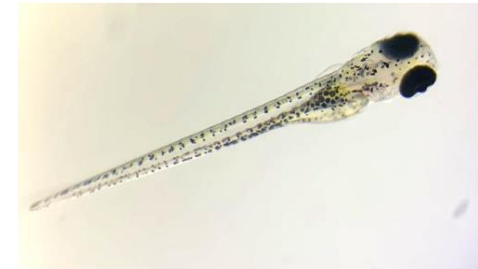
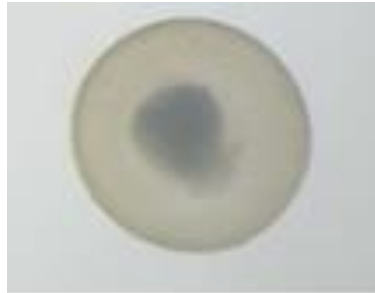
Anexo 11. Resultados de controles del ensayo en *Ruta graveolens* (Ruda)

Horas \ Controles	Positivo (DMSO 5%)	Solvente (DMSO 0.01%)	Negativo (Danieau's)
24			
48			

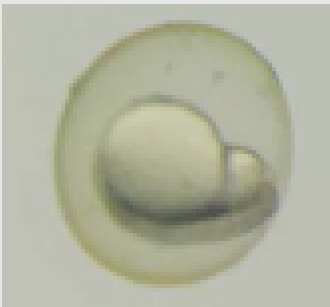

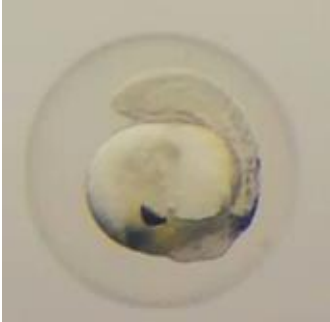
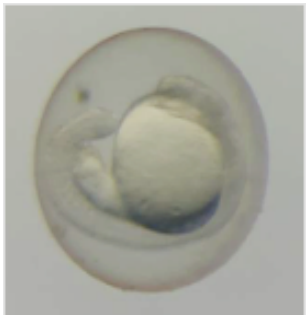
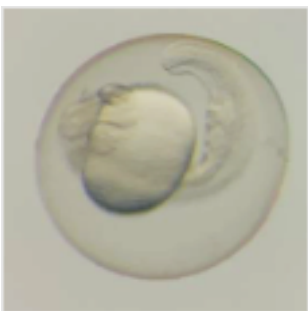


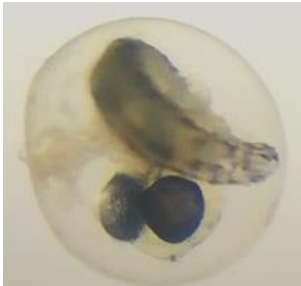
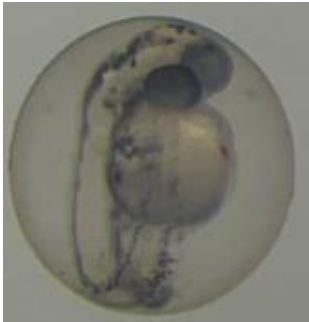
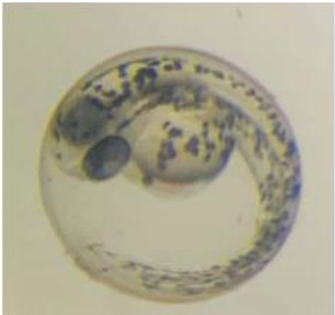
72



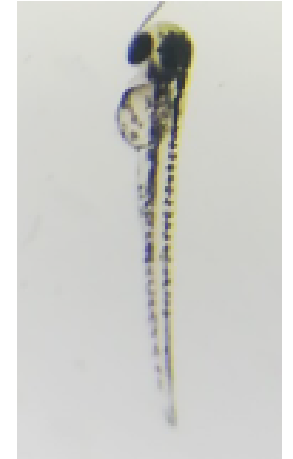
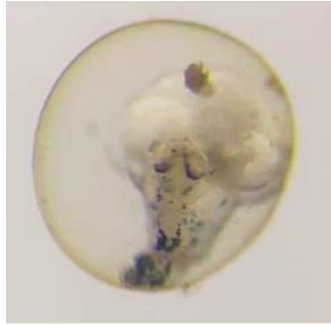
96



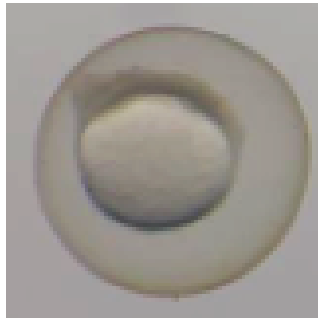
Anexo 12. Resultados de las concentraciones en
Phyllanthus anisolobus (Barbasco)

[C] Horas	12.5 ($\mu\text{g/mL}$)	6.25 ($\mu\text{g/mL}$)	3.125 ($\mu\text{g/mL}$)	1.5625 ($\mu\text{g/mL}$)	0.78125 ($\mu\text{g/mL}$)
24					
48					


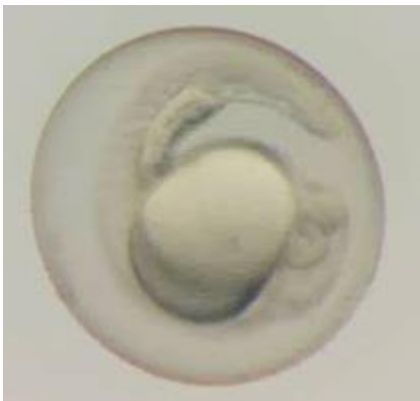




72



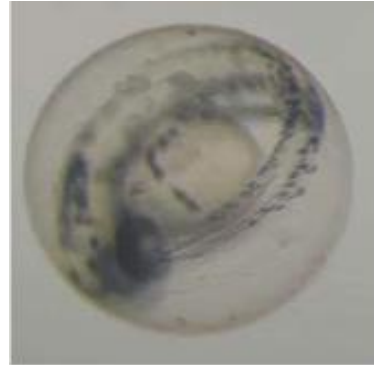
96



Anexo 13. Resultados de controles del ensayo en *Phyllanthus anisolobus* (Barbasco)

Horas	Controles	Positivo (DMSO 5%)	Solvente (DMSO 0.01%)	Negativo (Danieau's)
24				
48				

72



96



Anexo 14. Certificado de caracterización de *Phyllanthus Anisolobus*



Cuenca, 03 de marzo de 2022

A quien corresponda:

Su despacho.

Por petición de la parte interesada

Yo, Danilo Minga Ochoa curador del Herbario Azuay de la Universidad del Azuay, luego de haber revisado el material botánico traído por la señorita Esteisy Peralta y el señor Edison Bravo.

Certifico

Que las especies botánicas, colectadas y traídas al Herbario Azuay, se clasifican taxonómicamente de la siguiente manera:

- 1) **Familia:** PHYLLANTHACEAE **Especie:** *Phyllanthus anisolobus* Müll. Arg.
- 2) **Familia:** THYMELAEACEAE **Especie:** *Daphnopsis macrophylla* (Kunth) Gilg

Atentamente,

A handwritten signature in black ink that reads 'Danilo Minga Ochoa'.

Biólogo Danilo Minga Ochoa MSc.

Curador Herbario Azuay (HA)

Universidad del Azuay

Av. 24 de mayo 7-77

Cuenca, Ecuador

Tel. 07-4091000 ext. 443

E-mail: dminga@uazuay.edu.ec

<http://uazuay.edu.ec/HerbarioAzuay/>