

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS EXTRACTOS DE
Scutellaria Incarnata Y *Justicia pectoralis* SOBRE LINFOCITOS HUMANOS

DESIRÉE RÍOS YACUP

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN - CAUCA
2015

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS EXTRACTOS DE
Scutellaria Incarnata Y *Justicia pectoralis* SOBRE LINFOCITOS HUMANOS

DESIREE RÍOS YACUP

Trabajo de grado para optar al título de Bióloga

DIRECTOR:

M.Sc .CLARA INÉS GIRALDO

CODIRECTOR:

Ph.D. RICARDO BENÍTEZ BENÍTEZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN - CAUCA
2015

Nota de aceptación

Director _____

Clara Inés Giraldo M.Sc.

Jurado _____

Nohelia Cajas Salazar Ph.D

Jurado _____

Rene Zúñiga Rengifo M. Sc

Fecha y lugar de sustentación: Popayán, 28 de Septiembre de 2015

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	11
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. MARCO TEORICO	17
3.1 GENERALIDADES <i>Scutellaria</i>	17
3.1.2. <i>Scutellaria incarnata</i> Vent	17
3.3 GENERALIDADES <i>Justicia</i>	18
3.3.1 <i>Justicia pectoralis</i> Jacq	19
3.2.2 Información etnobotánica de los géneros <i>Scutellaria</i> y <i>Justicia</i>	20
3.3 Producto fitoterapéutico	21
3.4 Control de calidad de fitoterapéuticos	21
3.5 Citotoxicidad	22
3.6 Cultivos celulares	23
3.7 Ensayo colorimétrico de reducción de la resazurina	23
4. ANTECEDENTES	25
5. OBJETIVOS	40
5.1 Objetivo general:	40
5.2 Objetivos específicos:	40
6. MATERIALES Y METODOS:	41
6.1 PROCEDENCIA DEL MATERIAL VEGETAL	41
6.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES :	42
6.3 ESTUDIO DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA	42
6.3.1 Determinación de la calidad de Alamar Blue	42

6.3.2 Extraccion y cultivo de linfocitos.....	43
6.3.3 Determinacion de la longitud del tiempo de incubacion y la densidad optima de linfocitos	45
6.4 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD	46
6.4.1 Siembra de linfocitos.....	46
6.4.2 Adicion de tratamientos y Alamar Blue	47
6.4.3 Lecturas de absorbancia.....	49
6.5 ANALISIS ESTADISTICO	50
7. RESULTADOS	52
7.3.1 Determinacion de la calidad de Alamar Blue.....	52
7.3.2 Extraccion y cultivo de linfocitos	53
7.3.3 Determinacion de la longitud del tiempo de incubacion y la densidad optima de linfocitos	54
7.4 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD	55
8. DISCUSIÓN	67
9. CONCLUSIONES	74
10. SUGERENCIAS	76
11. BIBLIOGRAFIA	77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño General para los ensayos de Citotoxicidad	48
Tabla 2. Valores promedio de absorbancia obtenidos de Alamar Blue oxidado y reducido	52
Tabla 3. Valores promedio de absorbancia reportados en la literatura de la forma oxidada y reducida de Alamar Blue oxidado y reducido	52
Tabla 4. Porcentaje de linfocitos obtenidos de una muestra empleando Ficoll Hypaque.....	54
Tabla 5. Porcentaje de sobrevivencia de linfocitos humanos tratados con las ocho concentraciones de <i>J. pectoralis</i> y el control negativo (DMSO)	57
Tabla 6. Porcentaje de sobrevivencia de linfocitos humanos tratados con las siete concentraciones de <i>S. incarnata</i> y el control negativo (DMSO).....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hojas, tallo y inflorescencia de <i>S. incarnata</i> .	17
Figura 2. Inflorescencia de <i>J. pectoralis</i>	19
Figura 3. Absorbancia de Alamar Blue en la forma oxidada a una longitud de onda de 600 nm y en la forma reducida a 570 nm	24
Figura 4. Lugar de muestreo y colecta del material vegetal	41
Figura 5. Reactivo Alamar Blue en la forma oxidada y reducida	43
Figura 6. Distribucion de los componentes sanguineos en el gradiente de Ficoll-Hypaque despues de centrifugar	44
Figura 7. Formula para calcular la concentracion celular	45
Figura 8. Camara de Neubauer	45
Figura 9. Formula para calcular el pocentaje de reduccion	46
Figura 10. Celulas en microplacas de cultivo en medio RPMI tratadas con extractos de las plantas <i>S. incarnata</i> y <i>J. pectoralis</i>	48
Figura 11. Esquema general para evaluar el efecto de los extractos de <i>S. incarnta</i> y <i>J. pectoralis</i> , sobre la viabilidad de linfocitos	49
Figura 12. Formula de pocentaje de sobrevivencia	50
Figura 13. Porcentaje de reduccion de Alamar Blue versus densidad de linfocitos a las 8, 24, 48 horas	53
Figura 14. Linfocitos vistos en el microscopio Nikon (10x)	54
Figura 15. Porcentaje de reduccion de Alamar Blue versus horas de incubacion a densidades de 100.000, 200.000, 300.000, 400.000	55
Figura 16. Porcentaje de sobrevivencia celular de linfocitos humanos tratados con las siete concentraciones del extracto de <i>S. incarnata</i> y el control negativo..	59

Figura 17. Porcentaje de sobrevivencia celular de linfocitos humanos tratados con las siete concentraciones del extracto de *S.incarnata* y el control negativo durante 24 y 48 horas60

Figura 18. Porcentaje de sobrevivencia celular de linfocitos humanos tratados con las ocho concentraciones del extracto de *J. pectoralis* y el control negativo..... 62

Figura 19. Porcentaje de sobrevivencia celular de linfocitos humanos tratados con las ocho concentraciones del extracto de *J. pectoralis* y el control negativo durante 24 y 48 horas63

Figura 20. Curva de dosis- efecto que relaciona las concentraciones evaluadas del extracto *S.incarnata* con los porcentajes de sobrevivencia.....65

Figura 21. Curva de dosis- efecto que relaciona las concentraciones evaluadas del extracto de *J. pectoralis* con los porcentajes de sobrevivencia..... 66

RESUMEN

Los trastornos por ansiedad afectan entre el 5 y 10 % de la población general y en algunos casos los tratamientos farmacológicos son ineficaces (Eaton, 1995), razón por la que se siguen buscando nuevas opciones para su tratamiento, a través de alternativas basadas en productos naturales que tengan un mínimo de efectos colaterales (Sollozo *et al*, 2011). Las especies *Scutellaria incarnata* y *Justicia pectoralis*, son plantas que han sido empleadas en la medicina tradicional como tratamiento para el trastorno del estado ánimo, reportando mejoría sin consecuencias aparentes. Sin embargo, no se conoce si algunos compuestos químicos presentes en dichas plantas presenten o produzcan toxicidad en quienes las consumen.

Por esta razón, la evaluación de actividad citotóxica *in vitro* en células humanas, se emplea como tamizaje de productos de origen vegetal para garantizar su seguridad y ha sido usada en estudios de fase preclínica para la selección y desarrollo de nuevos fármacos ansiolíticos (Freshney, 2011). En este estudio se empleó una metodología colorimétrica fundamentada en la reducción del colorante Resazurina para la valoración de la citotoxicidad de 6 soluciones seriadas del extracto etanólico de *Scutellaria incarnata* a concentraciones de 25.000, 10.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.000 y 5 soluciones seriadas del extracto etanólico de *Justicia pectoralis* a concentraciones de 7.200, 5.000, 4.000, 3.000, 2.000 µg/ML, en linfocitos humanos de sangre periférica, simultáneamente fueron utilizados cultivos de linfocitos sin ningún extracto como control.

Los resultados expresan la sobrevivencia celular observada y fueron analizados estadísticamente por medio del análisis de varianza ANOVA ($p \leq 0.01$). Ninguna de las concentraciones evaluadas de los extractos produjo citotoxicidad en los linfocitos. Esta información proporciona los primeros resultados útiles en cuanto a la seguridad, debido a que es necesario seguir avanzando a través de una batería de pruebas como lo establecen las normas internacionales para garantizar un uso racional y seguro de productos fitoterapéuticos. Permitiendo así, integrarlas a los

sistemas de salud e introducirlas al mercado nacional e internacional mediante la comercialización.

INTRODUCCIÓN

La biodiversidad de plantas del departamento del Cauca es aprovechada desde tiempos inmemorables por los médicos tradicionales y promotores de la salud de la comunidad indígena Páez. Dichas civilizaciones utilizan la gran diversidad de especies vegetales del Cauca para tratar o aliviar enfermedades (Santander de Quilichao, Jesús Álvarez, Comunicación personal, 2012). Ejemplo de esto son las plantas “Alegría” *S. incarnata* y “Amansatoros” *J. pectoralis*, usadas por sus propiedades estimulantes y calmantes del sistema nervioso, permitiendo así controlar los síntomas que producen estados alterados del ánimo como la depresión, la angustia y la ansiedad (Andrade, 2003 ;Bernal *et al.*, 2011a; Sanabria, 2001).

Se ha estimado que existen más de 300 y 600 especies de plantas de los géneros *Scutellaria* y *Justicia* de beneficios para la salud. Del género *Scutellaria* respectivamente, de las cuales se ha reportado que tienen una amplia gama se ha considerado que son plantas que actúan sobre el sistema nervioso central y periférico ejerciendo una acción sedante sobre la medula espinal y el cerebro por inducir la producción de endorfinas que actúan como sedantes y tranquilizantes. Además alivia problemas asociados a jaquecas y migrañas. También se ha indicado que estas plantas tienen efectos antitumoral (Himeji *et al.*, 2007), antitrombotico, antiespasmódico, antioxidante (Gao *et al.*, 1999; Shinella *et al.*, 2002), hepatoprotector y anticonvulsivo (Wang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009). Sobre el género *Justicia*, los principales usos reportados se refieren a la sedación, que incluye propiedades calmantes y somníferas para el tratamiento de afecciones nerviosas. También son usadas para el tratamiento de enfermedades digestivas, artritis, ictericia, cefalea, hemiplejía y eczema (Graham, 1988 a; Pérez *et al.*, 2001b; Rodríguez *et al.*, 2003 a).

Tanto por el uso ancestral como por estudios recientes, las plantas “Alegría” *S. incarnata* y “Amansatoros” *J. pectoralis* son consideradas como especies

medicinales con gran potencial para ser comercializadas a nivel farmacéutico (Bernal *et al.*, 2011a). Dada esta condición, existe un interés en el desarrollo de procesos para la obtención de sus extractos a escala industrial reuniendo los requisitos de calidad, seguridad y eficacia según la normatividad internacional y nacional (Guevara *et al.*, 2010).

El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento mediante la evaluación de la actividad citotóxica de los extractos de *S. incarnata* y *J. pectoralis*, sobre linfocitos humanos, ya que esta información será útil para definir la seguridad de estos productos para los consumidores.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos estudios realizados le confieren a los géneros *Scutellaria* y *Justicia* una cualidad medicinal. Países como USA, China y Costa Rica producen y comercializan tabletas y extractos en polvo que se suministran para el tratamiento y curación de una variedad de enfermedades tanto físicas como anímicas en humanos (Awad *et al*, 2003; Iraizos ,2004; Rodríguez *et al*, 2008 b).

En Colombia, la empresa agroindustrias SAVIA del departamento del Cauca, pretende comercializar extractos de las plantas *S.incarnata* y *J.pectoralis* para tratar trastornos del sistema nervioso, para lo cual debe cumplir con la normatividad estipulada por el INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos) en el decreto 677 de 1995, el cual exige que se garantice la calidad, seguridad y eficacia de productos farmacéuticos preparados a base de recursos naturales (Decreto 677, 1995).

La seguridad de un producto farmacéutico se refiere a la ausencia de toxicidad o reacciones adversas demostrada en humanos o animales. Esta seguridad debe ser evaluada debido a que se ha comprobado efectos adversos sobre la salud humana provocados por plantas medicinales. Según reportes internacionales, la ingesta de plantas produce entre 1 a 2 % de todas las intoxicaciones, la mayoría son accidentales y el 85 % de los casos afectan a los niños, sobre todo los menores de 6 años y la muerte por ingesta de vegetales tóxicos representa 0,2 % de todas las muertes en intoxicados agudos (Dueñas ,2010). En la mayoría de los casos son plantas empleadas tradicionalmente, pero que no cuentan con estudios toxicológicos suficientes, por lo que la información que se tiene es escasa, tal es el caso de cúrbana *Canella winterana*, empleada en afecciones reumáticas y en artritis; yaba *Andira inermis*, utilizada como antiparasitaria, ruda *Ruta graveolens* empleada para la epilepsia (fitotox, 2007).

De esta manera aunque la seguridad de las plantas *S. incarnata* y *J. pectoralis* está demostrada a través de su uso durante muchos años sin consecuencias

aparentes, desde el punto de vista científico no existe información reportada sobre la toxicidad de los compuestos activos de dichas especies en humanos (Bernal *et al.*, 2011a).

Antes de que la seguridad de los extractos de las plantas *S.incarnata* y *J.pectoralis* pueda ser determinada en seres humanos siguiendo un método científico, es necesario realizar ensayos a nivel preclínico, cuyos resultados ofrezcan una información base sobre la toxicidad de sus compuestos activos (CYTED, 1995).

Por lo anterior se propone realizar pruebas *in vitro*, como parte del conjunto de pruebas para garantizar la seguridad, empleando linfocitos de sangre periférica sometidos a diferentes concentraciones de los extractos de *S.incarnata* y *J.pectoralis* y a través del análisis de resultados determinar su nivel de toxicidad y una concentración que corresponda a la Concentración Inhibitoria 50 (CI 50), sobre la cual se pueda recomendar una dosis de uso en humanos, que no genere efectos adversos para la salud, para posteriormente realizar ensayos a nivel clínico.

2. JUSTIFICACIÓN

La fitomedicina o ciencia que se fundamenta en el tratamiento de enfermedades por medio de las propiedades curativas de las plantas, se ha convertido en una opción para más del 80% de la población mundial (OMS 2000, Sollozo *et al*, 2011). Muchos de estos fármacos de origen natural actualmente ocupan un lugar dominante en la terapia de enfermedades anímicas como la angustia, depresión y ansiedad, ocasionadas por el estrés que afronta la sociedad actual relacionada con el sistema de vida adoptado.

En la actualidad, a través del Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales se han registrado cerca de 40 especies de plantas aprobadas para su uso terapéutico, de las cuales la planta “amansatoros” *J. pectoralis*, registra 22 actividades medicinales diferentes y 76 menciones de uso tradicional. Los principales usos reportados se refieren a la sedación, que incluye propiedades como calmante y somnífero (Ministerio de la Protección Social, 2008). *S. incarnata* todavía no se encuentra registrada en el Vademécum, aunque el Instituto Humboldt la incluyera en un listado preliminar de especies de plantas medicinales, debido a que esta especie es utilizada por comunidades indígenas para tratar estados alterados del ánimo como la depresión (Bernal *et al*; 2011).

Conociendo esta situación, Agroindustrias Savia creada en el departamento del Cauca, identificó una oportunidad de negocio con las plantas “alegría” *S. incarnata* y “amansatoros” *J. pectoralis*, (Santander de Quilichao, Jesús Álvarez, comunicación personal, 2014). El biocomercio, entendido como el conjunto de actividades de recolección, producción, procesamiento y comercialización de bienes y servicios derivados de la biodiversidad nativa, bajo criterios de sostenibilidad ambiental, social y económica, ha sido priorizado dentro de las apuestas productivas del departamento del Cauca y cuenta con una gran potencialidad de mercado. De esta manera, Agroindustrias SAVIA se fijó como meta la creación de una microempresa para la producción de esencias florales o

extractos de alegría y amansatorios, bajo la normatividad estipulada por el INVIMA, la cual se viabilizó gracias al desarrollo de un proyecto financiado por Colciencias.

Para responder a esta necesidad se ha centrado el interés en las metodologías alternativas *in vitro*, modelos que pueden generar resultados con validez internacional, relativamente económicos, rápidos y sencillos, además de que contribuyen a la reducción del empleo de animales de laboratorio y abren la posibilidad de realizar estudios a nivel molecular (Freshney, 2011).

La evaluación de la actividad citotóxica es un modelo biológico reproducible y verificable, que constituye una herramienta de gran valor en las primeras etapas de selección y desarrollo de un fitofármaco o medicamento (León., *et al* 2006). De esta manera el desarrollo de esta investigación, ofrecerá una primera información sobre los compuestos activos de *S. incarnata* y *J. pectoralis*, sobre la salud humana, con la finalidad de proporcionar los soportes necesarios para el uso adecuado de las mismas, ya que a estas especies se les atribuye propiedades ansiolíticas, pero no cuentan con una base científica que sustente su seguridad.

3. MARCO TEÓRICO

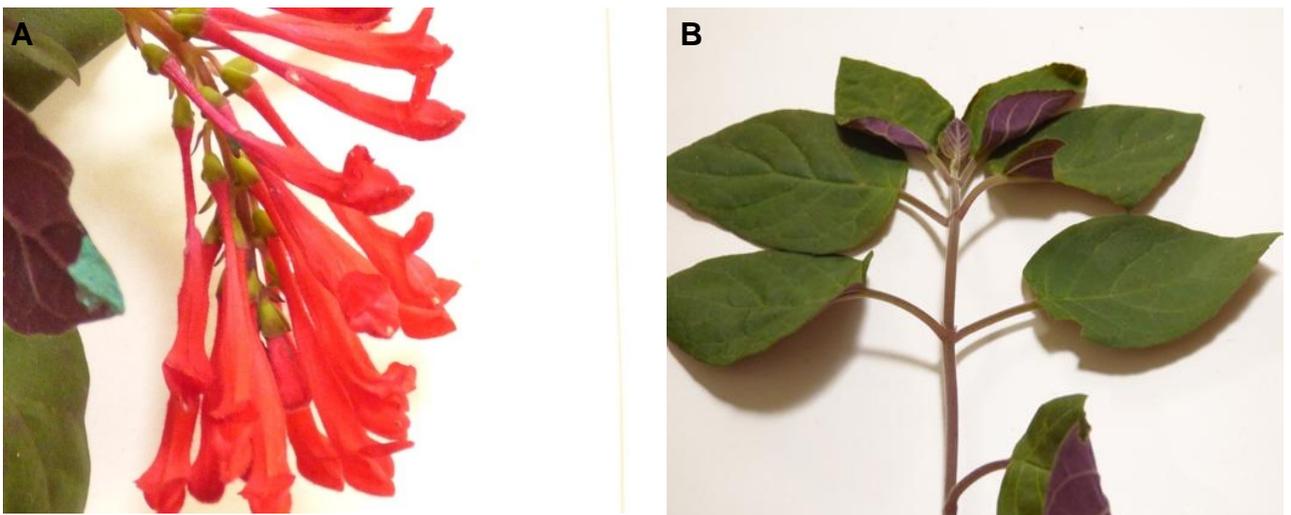
3.1 GENERALIDADES: *Scutellaria*

Scutellaria es un género de la familia Lamiaceae con una amplia distribución que comprende alrededor de 350 especies herbáceas, utilizadas ampliamente en los sistemas médicos tradicionales de China, Corea, India, Japón, muchos países de Europa y América del Norte, como una hierba medicinal para el tratamiento de enfermedades como cáncer, cirrosis, ictericia, hepatitis y los trastornos nerviosos como la ansiedad, además estimula la menstruación (Cole *et al.*, 2007). La variedad de hierbas comúnmente aprovechadas son *S. baicalensis*, *S. lateriflora*, *S. racemosa*, *S. tomentosa* y *S. wrightii* (Song, 1981).

Estudios de caracterización fitoquímica de las especies de *Scutellaria* sugieren que pueden tener la presencia de aproximadamente 60 flavonoides, los cuales han sido aislados e identificados de raíces, tallos y hojas, entre estos se destacan acteosida, scutellarina, baicalina, baicaleína, wogonina, wogonoside, apigenina, crisina, y oroxylin A. Estas moléculas indican alguna actividad relacionada con su poder curativo y sobre todo su poder relajante del sistema nervioso (Joshee *et al.*, 2002).

3.1.2 *Scutellaria incarnata* Vent

Figura 1. A. Hojas y tallo B. Inflorescencia de *Scutellaria incarnata*.



Hierba con hojas opuestas, inflorescencias cuyo eje tiene una flor en su extremo terminal, los elementos florales se disponen formando pisos o capas, corola con pétalos soldados, la mayoría de veces bilabiada (Duke, 1990; Ezer *et al.*, 1998; Graham *et al.*, 2000 b; Hui *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001; Skaltsa *et al.*, 2000; Stojakowska y Kisiel, 1999; Yaghmai, 1988; Zargari, 1990). La planta se encuentra distribuida en Colombia, en el Departamento del Cauca en los municipios de Cajibío, Popayán, el tambo, Piendamó, la Sierra y Totoró entre los 1300 y 1920 msnm.

Reportes recientes del tamizaje químico de *S. incarnata*, sustentan la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, los cuales tienen propiedades antidepressivas (Ordoñez and Pineda, 2013). También cumarinas, saponinas y taninos caracterizados por presentar efectos sedantes y antiinflamatorios (Ordoñez and Pineda, 2013).

3.2 GENERALIDADES: *Justicia*

El género *Justicia* es el más grande y complejo de la familia de las Acantáceas a nivel mundial, y el de mayor número de especies en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano. Este género comprende aproximadamente 600 especies de hierbas y arbustos perennifolios (Graham, 1988 a). Numerosas especies de *Justicia* han sido utilizadas en muchos sistemas de medicina tradicional y son conocidos entre las tribus nativas americanas, por ejemplo *J. pectoralis* es empleada en decocción para aliviar afecciones pulmonares, especialmente la neumonía. Es además expectorante, sedante y calmante. La *J. secunda* es utilizada en Colombia como diurético e hipoglicemiante (Fuentes and Granada, 1982). Las hojas de *J. gendarussa* han sido tradicionalmente utilizadas en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso, la artritis, ictericia, cefalea, hemiplejía, eczema etc. (Kirtikar and Basu, 1975).

Una gran diversidad de clases químicas halladas en las especies de *Justicia*, principalmente alcaloides, lignanos, flavonoides y terpenoides, están relacionadas

con el poder antidepresivo y antiestrés. Otras clases químicas han sido aisladas de especies de *Justicia*, tales como aceites esenciales, vitaminas, ácidos grasos, y ácido salicílico (Al-Juaid y Abdel-Mojib, 2004; Angonese *et al*, 1992).

3.2.1 *Justicia pectoralis* Jacq

Figura 2. A. Inflorescencia de *Justicia pectoralis* B. Hojas y tallo.



Esta es una hierba olorosa que puede alcanzar aproximadamente 30 cm. de altura, de ramas delgadas, rastreras y ligeramente engrosadas en los nudos, presenta un tallo cilíndrico de color verde y abundantes pelos. Tiene hojas simples de color verde más intenso por la cara superior, lanceoladas, opuestas transversalmente, de base estrecha y ápice agudo, pueden medir de 4,5-6,5 cm. de largo y 1,0-1,5 cm. de ancho, con el pecíolo corto. Además presenta inflorescencia terminal erecta con numerosas flores pequeñas de color rosado; el fruto es una cápsula pequeña de color marrón (Oliveira and Andrade, 2000; Sánchez *et al.*, 2003). Para Colombia la planta se encuentra distribuida en el

departamento del Cauca en los municipios de Santa Rosa, Santander de Quilichao y Popayán (Bernal *et al.*, 2011a).

Entre los componentes químicos identificados se encuentran cumarinas, las cuales poseen propiedad anestésica, hipnótica, narcótica y sedativa, flavonoides, los cuales se caracterizan por tener propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. También lignanos como justicidin B asociado con la actividad antidepresiva y antiarrítmica. Vitaminas como el ácido ascórbico (C), con propiedades analgésicas, antidepresivas, antimigraña, antiparkinson, complejo de vitaminas B: Niacina (B3), que presenta propiedades anticonvulsiva, antiepiléptica, antiinsomnio, antineurálgico, antiparkinson, sedativas y serotoninérgicos entre otras. tiamina (B1), la cual posee actividad de analgésico, antialzheimer, antianoréxico, antifatiga, antimigraña, antineurálgico, antineuropático, entre otras. (Joseph *et al.*, 1988; Lino *et al.*, 1997).

3.2.2 Información etnobotánica de los géneros *Scutellaria* y *Justicia*

Las especies de los géneros *Scutellaria* y *Justicia* son plantas que aparecen repentinamente en los reportes sobre estudios etnobotánicos a nivel mundial. La especie *S. baicalensis* se usa en China para tratar infecciones a nivel respiratorio y gastrointestinal. En Japón la especie *S. barbata* es usada para el tratamiento de cáncer de próstata. En Estados Unidos y Europa la especie *S. lateriflora* se usa como sedante y para el tratamiento de trastornos nerviosos. En Centroamérica la especie *S. racemosa* es usada para tratar enfermedades hepáticas, estomacales y cardíacas; y en Colombia la especie *S. incarnata* es usada como sedante, antidepresivo y antigripal (Cole *et al.*, 2007; Sanabria, 2001; Song, 1981).

Por otra parte, la especie *J. secunda* se usa en países como Cuba, Trinidad y Tobago; sirve para el tratamiento de la hipertensión arterial; cálculos renales, enfermedades de la próstata y miomas en el útero. En Brasil *J. carnea* es usada como broncodilatador y antiinflamatorio. En Cuba y Colombia *J. pectoralis* es

reportada como desinfectante, cicatrizante, sedante expectorante y astringente (Fuentes y Granada, 1982; Graham, 1988 a; Jarvis *et al.*, 2006).

3.3 PRODUCTO FITOTERAPÉUTICO

Según la definición de la (OMS, 2009) es un producto medicinal empacado y etiquetado, cuyas sustancias activas provienen de una planta medicinal o asociaciones de estas, presentado en estado bruto o en forma farmacéutica, que se utiliza con fines terapéuticos. También puede provenir de extractos, tinturas o aceites. No podrá contener en su formulación principios activos aislados y químicamente definidos. Los productos obtenidos de una planta medicinal y que hayan sido procesadas y obtenidas en forma pura no serán clasificados como productos fitoterapéuticos (OMS, 2009).

3.4 CONTROL DE CALIDAD DE FITOTERAPÉUTICOS

INVIMA Decreto 677 de 1995

En Colombia a través del Decreto 677 de 1995, se establece que las preparaciones farmacéuticas a base de recursos naturales que tradicionalmente han sido utilizados en forma empírica con fines terapéuticos y a través de este uso y por la sustentación bibliográfica, serán considerados eficaces y seguros; sin embargo deberán estar sometidos a un estricto control para garantizar la eficacia seguridad y calidad. Estas preparaciones deben estar sujetas a controles de calidad, antes y después del producto terminado, este proceso comprende ensayos físicos, químicos y microbiológicos (Decreto 677, 1995).

También es importante establecer y garantizar que su utilización no representa un riesgo para la población, que diariamente hace uso de estos productos. Por lo que resulta indispensable realizar ensayos preclínicos que comprenden metodologías que se realizan *in vitro* o *in vivo* para estudiar la actividad y mecanismo de acción de plantas con propiedades terapéuticas (Guevara *et al.*, 2010).

Además como producto terapéutico de uso tradicional, es indispensable determinar el potencial tóxico a través de la concentración Inhibitoria 50 (CI50), de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado (Guevara *et al.*, 2010).

3.5 CITOTÓXICIDAD

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado. Este efecto puede ser causado por diversos tipos de sustancias químicas, agentes físicos o mecanismos biológicos. La citotoxicidad *in vitro* es una herramienta útil para la identificación de compuestos que inducen muerte celular y las concentraciones de dicho compuesto que llevan a tal fin. Entre estas alteraciones se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular (Repetto, 2002).

Muchos experimentos *in vitro* tienen el propósito de determinar el potencial citotóxico de diferentes compuestos sintéticos o naturales, ya que estos se usan como fármacos o como cosméticos y deben demostrar que no son tóxicos (Freshney, 2011). Entre los métodos para evaluar citotoxicidad se encuentran los ensayos colorimétricos, y entre los más conocidos y ya validados se encuentran el ensayo de captación del rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid, reducción del colorante (MTT) con formación de formazan y por último el ensayo de reducción del colorante resazurina con formación de resofurina. Estos ensayos son empleados por que son de bajo costo, fácilmente cuantificables y reproducibles (Isolabella, 2005).

3.6 CULTIVOS CELULARES

Los cultivos celulares son un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células '*in vitro*', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas, son usadas para el estudio del comportamiento de las células *in vitro*, bajo el estrés de un experimento. Los cultivos celulares ofrecen la ventaja de mantener un control preciso y fino del ambiente. Sin embargo pueden suponer algunas desventajas ya que son técnicas sensibles, por lo tanto deben ser manipuladas por personal capacitado y necesitan además instalaciones adecuadas (Albert, *et al* 2002).

Los cultivos celulares de linfocitos humanos, son adecuados como un sistema de prueba para evaluar citotoxicidad a causa de que son células circulantes del sistema inmunitario que reaccionan frente a materiales extraños y son de alta jerarquía en el sistema inmunitario, principalmente encargadas de la inmunidad específica o adquirida. Estas características, han hecho que constituyan un parámetro básico para la evaluación de la toxicidad de un producto de consumo oral, ya que permiten obtener a nivel bioquímico, metabólico y funcional resultados muy predictivos para el hombre (Del Valle *et al.*, 2002).

3.7 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD COLORIMÉTRICO DE REDUCCION DE LA RESAZURINA

La resazurina es un compuesto oxidado (azul no fluorescente) que presenta un pico de mayor absorbancia a 600 nm y es reducida a resorufina (rojo altamente fluorescente) cuya absorbancia es de 570nm (Rampersad, 2012).

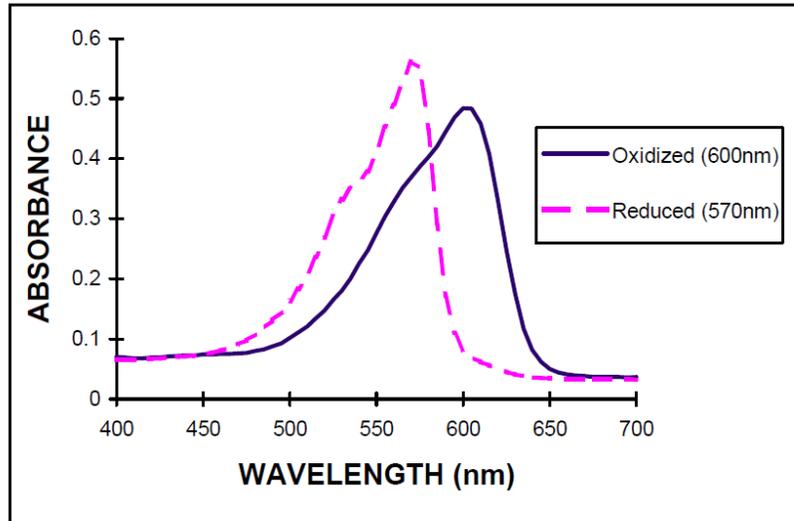


Figura 3. Absorbancia de AlamarBlue en la forma oxidada a una longitud de onda de 600nm y en la forma reducida a 570nm

Los ensayos de citotoxicidad colorimétricos son métodos que incorporan un indicador redox en el medio de cultivo que cambia de color cuando existe crecimiento de células *'in vitro'* facilitando la lectura visual del mismo (Bernal, 2011b).

La resazurina es un compuesto no tóxico y es reducido en las células, dentro de la mitocondria a resorufina, lo que es útil también para evaluar la actividad metabólica mitocondrial, generando de ese modo una medida cuantitativa de la viabilidad y la citotoxicidad (Fields and Lancaster, 1993). La resazurina se utiliza principalmente como un indicador de oxidación-reducción en ensayos de citotoxicidad para detectar viabilidad celular de células de mamíferos y bacterias. AlamarBlue es un producto reactivo comercial, cuyo ingrediente activo es la resazurina, utilizado para diversos estudios de actividad biológica de compuestos, ya sea en líneas celulares normales como en líneas celulares tumorales (Rampersad, 2012).

4. ANTECEDENTES

4.1 Caracterización fitoquímica de los géneros *Scutellaria* y *Justicia*

Debido a que en la información recopilada entre diferentes comunidades sobresalen las propiedades farmacológicas de estas especies, ha habido un creciente interés por el estudio a nivel científico de las características de estas plantas.

Varios estudios sustentan que diversas especies de *Scutellaria* y *Justicia* contienen fitoquímicos responsables de sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, ansiolíticas, neuroprotectoras, antitromboticas, anticancerígenas y antimicrobianas. Evidencia de esto, son más de 295 compuestos que han sido aislados, de las especies de *Scutellaria*, entre ellos flavonoides, glucósidos feniletanoides, glucoproteínas, iridoides, diterpenos, triterpenoides, alcaloides, fitoesteroles, polisacáridos y otros compuestos. Algunos de ellos han mostrado bioactividad *in vivo* o *in vitro* (Gao *et al.*, 1999; Himeji *et al.*, 2007; Shinella *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009 c) y más de 160 compuestos, incluyendo flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, biflavonoides, flavonolignandos y chalconas, ya han sido aislados (Shang *et al.*; 2010).

Dentro de este grupo de compuestos está la baicaleina, baicalina, oroxylin A, wogonina, wogonoside, apigenina, scutellarina, luteolina, viscidulin III, y ganhuangenin. Se ha confirmado que la presencia de los compuestos mencionados en las especies *S. baicalensis*, *S. barbata*, *S. laterifolia*, tienen acción antitumoral, hepatoprotectora, antioxidante, anti-inflamatorio, anti-RSV (virus sincitial anticuerpo), antimutagénico, neuroprotector, ansiolítico, y otras actividades. La relación entre las estructuras de los compuestos y sus actividades se han descubierto. Por ejemplo la baicaleina, wogonina y wogonoside muestran una inhibición más fuerte hacia la histamina y la producción de inmunoglobulinas (IgE), que la (3,5,7,2 '6 pentahidroxiflavona). Por otra parte la (3, 5, 7,2 '6 pentahidroxiflavona) presenta dos grupos hidroxilo, demostrado tener mayor

actividad que la wogonina y wogonosida contra la peroxidación lipídica (Lee *et al*; 2003 c).

En cuanto a las chalconas se han aislado compuestos como Amoenin A en *S. amoena* además se han aislado cinco chalconas simples de *S. indica* (Zhou and Yang, 2000). En las plantas *S. discolor* y *S.baicalensis* se aislaron (2',4' - dihidroxi-2, 3,6' -trimetoxi-chalcona) y (2,6,2',4' - tetrahidroxi-6' -metoxichalcona) (Tomimori *et al.*,1984).

El análisis de huella digital química se ha introducido y aceptado por la OMS (1991), SFDAC (2000) y otras autoridades como una estrategia de evaluación de la calidad de hierbas medicinales como un medio de reconocimiento rápido y fiable para la identificación y la calificación de los medicamentos a base de hierbas medicinales. Se realizó un estudio de análisis de huella digital química empleando especies del genero *Scutellaria*. Los resultados demostraron que el contenido de baicalina está entre 6-9%, wogonina entre 2-8%, baicaleína entre 0.1-1.6%, wogonosida entre 0.01-0.3%, viscidulin I y algunas trazas de oroxylin A. Las hierbas nativas y no nativas presentes en el género *Scutellaria* no presentaron claras diferencias en las proporciones de componentes absolutos. La relación de baicalina y wogonosida estaba bajo tres. La relación de baicalina y baicaleína, baicalina y wogonina era entre veinte y cincuenta (Kim *et al.*, 2007 b).

Por otro lado, una gran diversidad de clases químicas se han identificado en las especies del género *Justicia*, principalmente alcaloides, lignanos, cumarinas, flavonoides y terpenoides de tipo iridoides, diterpenoides y triterpenoides. Otras clases químicas han sido aislados de especies de *Justicia*, tales como aceites esenciales, vitaminas, ácidos grasos (ácido docosanoico), y ácido salicílico (Angonese *et al*, 1992;. Al-Juaid and Abdel-Mojib, 2004).

Los esteroides como campesterol, estigmasterol, sitosterol, y sitosterol-D-glucósido fueron aislados de las hojas y raíces de *J. flava*, *J.*

spicigera y *J. gendarussa* (Olaniyi, 1980; Wahi *et al*, 1974; Domínguez *et al*, 1990; Amborabé *et al*, 2002; Deepak *et al*, 2002; Rajakumar and Shivana, 2009).

La literatura ha descrito el efecto alelopático de los esteroides y triterpenos. Estas clases químicas se han aislado del extracto alcohólico de la raíz y de las partes aéreas de *J. anselliana* mostrando efectos alelopáticos en el crecimiento y reproducción de plantas legumbres (Kpoviessi *et al.*, 2006).

También se han aislado una gran variedad de lignanos de especies de *Justicia*. Los lignanos son un gran grupo de productos naturales que muestran diversos efectos biológicos. Los lignanos pueden servir como compuestos de plomo para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos con actividad citotóxica (Fukamiya and Lee, 1986; Hui *et al*, 1986). Por ejemplo, los lignanos obtenidos de *J. pectoralis* son citotóxicos a células leucémicas y líneas celulares de tumores sólidos (Hui *et al.*, 1986).

Los lignanos también muestran efectos antiangiogénico, antileishmania, antifúngicos, hipolipemiente, antiasmático (Vasilev and Ionkova, 2005), antiviral, anticanceroso (Gordaliza *et al.*, 2000), insecticida, cardiotónico, antidepresivo (Ghosal *et al*, 1979), analgésico, antiplaquetario (Chen *et al.*, 1996), y antiinflamatoria (Navarro *et al.*, 2004).

Las actividades antiinflamatorias se han descrito por los lignanos glucósidos aislados de *J. ciliata* (Day *et al.*, 2000) y compuestos fenólicos aislados de *J. prostrata* (Sanmugapriya *et al.*, 2005).

En contraste se ha demostrado que las cumarinas aisladas de las especies *Justicia*, poseen propiedad anestésica, hipnótica, narcótica y sedativa entre otras. Otros estudios demuestran su efecto analgésico, antiinflamatorio que actúan a nivel de macrófagos estimulando la fagocitosis, depresor central y periférico, espasmolítico, vasodilatador y antimicótico (Lino *et al.*, 1997). Estudios fitoquímicos han identificado la presencia de cumarinas de tipo 1,2-benzopirona y

umbeliferona, ésta última es el constituyente más activo del género *Justicia*, y unos de los principales constituyentes de *J. pectoralis*, encontrándose mayoritariamente en las hojas de la planta (Lino *et al.*, 1997; Oliveira y Andrade, 2000).

En este contexto muchos compuestos químicos son comunes en los géneros *Scutellaria* y *Justicia*, como flavonoides y cumarinas, los cuales estarían implicados en la actividad ansiolítica. Por ejemplo en estudios fitoquímicos de las especies *S. incarnata* y *J. pectoralis*, se han identificado sustancias químicas en común, como la presencia de flavonoides y cumarinas (Alarcón, 2005; Ordoñez and Pineda, 2013); Estos resultados apoyan el uso tradicional que se le ha dado a dichas plantas ya que la presencia de flavonoides en *S. incarnata* justificaría el uso como antidepresivo y antiestrés, así como la presencia de cumarinas relacionadas con la actividad anestésica y sedativa en *J. pectoralis* (Lino *et al.*, 1997).

4.2 Estudios de actividad biológica de *Scutellaria*

Estudios fitoquímicos revelan el contenido fenólico de diez flavonoides obtenidos de raíces, tallos y hojas en *S. wrightii*, *S. tomentosa*, *S. baicalensis*, *S. lateriflora* y *S. racemosa*, que incluyen acteosida, scutellarin, baicalina, baicaleína, wogonina, wogonoside, apigenina, crisina, y oroxylin A. Estos compuestos han sido seleccionados por su actividad antitumoral en diversos procesos celulares como la apoptosis y la angiogénesis (Pérez *et al.*, 2010 c).

Por ejemplo, la acteosida ha manifestado que inhibe la proliferación celular promielocítica de leucemia humana (HL-60) a través de la inducción de la detención del ciclo celular en la fase G0/G1 y la diferenciación en monocitos (Lee *et al.*, 2007a), la baicalina ha demostrado que induce la apoptosis en carcinoma mucoepidermoide de células humanas MC3 *in vivo* e *in vitro* (Xu *et al.*, 2011). Según (Parajuli *et al.*, 2009), los flavonoides como apigenina, baicaleína, baicalina, crisina, wogonina, scutellarina, presentes en trece especies del género *Scutellaria*

han demostrado inhibir la proliferación de células del glioma maligno y carcinoma de mama, sin afectar las células primarias.

En un estudio se encontró que los extractos de hojas, tallo y raíz de *S. angulosa*, *S. integrifolia*, *S. ocmulgee*, y *S. scandens*, tienen una fuerte actividad contra el cáncer. A través del ensayo MTT y citometría de flujo basado en el análisis del ciclo celular, se determinaron los efectos específicos sobre la proliferación celular, apoptosis y progresión del ciclo celular del glioma maligno, carcinoma de mama y células de cáncer próstata. Como resultado se obtuvo que los extractos individuales de hojas, tallo y raíz en concentraciones de 40 mg/mL inhibieron la proliferación de las células de glioma maligno, carcinoma de mama, induciendo la apoptosis y la detención del ciclo celular en G1/G2, sin afectar las células normales (Parajuli *et al.*, 2009).

El mismo efecto fue estudiado empleando el extracto de *S. barbata*, en dosis de 10, 20, 30, 40 g/ día. El extracto de *S. barbata*, resultó inhibir el crecimiento de más del 50 %, de cuatro líneas celulares de cáncer de mama, evaluados *in vitro*. En contraste, la dosis de 40g/ día, de *S. barbata*, no causó inhibición del crecimiento de más del 50 % de las células epiteliales mamarias normales. La selectividad citotóxica de *S. barbata*, para las células cancerosas, se basa en las preferencias metabólicas de las células tumorales, debido básicamente a que los niveles basales de las especies reactivas de oxígeno son mayores y las altas tasas de glicolisis anaerobia en el citosol para la producción de energía, seguidas por un proceso de fermentación láctica, generaría que las células de cáncer sean significativamente más vulnerables a la muerte inducida por *S. barbata* de forma opuesta a las células normales (Pérez *et al.*, 2010 a).

De la misma manera estudios *in vitro*, han demostrado que la especie *S. baicalensis* inhibe la síntesis de las prostaglandinas y la proliferación de células tumorales a concentraciones iguales y superiores a 150 mg/mL, produciendo una detención del ciclo celular en G0-G1 (Zhang *et al.*, 2003 a). Es interesante destacar que el extracto de esta planta inhibe selectivamente la proliferación de

las células tumorales sin afectar el crecimiento de otras células normales como los linfocitos. Se cree que esta actividad antitumoral se debe a varios factores, uno de los cuales sería la inhibición de la síntesis de prostaglandinas debido a una inhibición de la COX-2. Sin embargo, la baicalina, el componente más importante del extracto de *S. baicalensis* (80%) no afecta a la síntesis de las prostaglandinas, lo que indica que son otros los componentes de esta planta que pueden actuar sinérgicamente, mostrando una potente actividad aunque sean minoritarios (Fei *et al.*, 2002)

Por otro lado en un estudio se demostró que el extracto etanólico de *S. baicalensis*, tiene efectos antiinflamatorios y antioxidantes, evaluados en células de macrófago murino RAW 264.7 y células de microglia BV2 de ratón tratados con la D-galactose y NaNO₂ por vía intraperitoneal, los cuales inducen patrones similares de envejecimiento y síndromes senescentes especialmente el deterioro de la memoria en los seres humanos. Se registraron los cambios neuropatológicos de células del hipocampo de ratón a través de microfotografías teñidas con cristal de violeta y se midió el nivel de peroxidación lipídica homogeneizado de cerebro, que indica el contenido de malondialdehído (MDA) en el tejido cerebral. El tratamiento con *S. baicalensis*, a una dosis de 50 y 100 mg / kg mejoró significativamente el deterioro cognitivo y la disminución de la generación de la MDA y la reducción de la producción de radicales libres, además atenúo la neuroinflamación y la isquemia en los animales, Estos hallazgos demuestran que *S. baicalensis* puede proteger el cerebro contra el estrés oxidativo, disminuyendo el daño oxidativo inducido por D-galactosa y NaNO₂ (Jeong *et al.*, 2011).

Se ha reportado que la flavona en la especie *S. barbata* puede reparar la membrana celular de las células y evitar infección por virus de parainfluenza tipo 1 (PIV-1) (Shang; *et al.*, 2010). Por otro lado se ha encontrado que el linalool, un compuesto químico aislado de la especie *S. albida* mostro efectos altamente tóxicos contra *S.aereus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, además de su actividad antibacteriana frente a hongos patógenos de plantas (Tan and Vanitha, 2004). De esta manera los estudios pertenecientes a este género revelan que los

flavonoides son los principales componentes que contribuyen a la bioactividad de *Scutellaria* (Boyle *et al.*, 2011).

También se ha comprobado el efecto hepatoprotector del extracto de *S. baicalensis*, a través de ensayos *in vitro*, los resultados confirman que esta planta posee un potente efecto inhibitor del crecimiento de células de hepatocarcinoma HepG2. El efecto parece ser debido a baicalina, dicho flavonoide presenta actividad antioxidante y antiinflamatoria además de proteger al hígado de la toxicidad aguda y crónica inducida por tetracloruro de carbono, acetaminofén o concanavalina A. Por consiguiente al suministrar una dosis de 300 mg /kg el extracto de *S. baicalensis*, estimula el crecimiento de los hepatocitos en la regeneración del hígado (Lee *et al*; 2011a).

El efecto hepatoprotector también fue evaluado en varias fracciones (n-hexano, CHCl₃. EtOAc, n-BuOH y H₂O) de *S. barbata*, en tres modelos experimentales *in vivo*. Los resultados indicaron que la fracción de n-hexano y la fracción CHCl₃ son las más potentes contra D-galactosamine (DGalN) que induce intoxicación, además la fracción de CHCl₃ tiene un mayor efecto protector del hígado sobre el efecto hepatotxico inducido por el acetaminofén (APAP). Los cambios patológicos debido a lesiones hepáticas mejoraron por el tratamiento de la fracción mencionada (Lee *et al* 2009 d, 2011b).

Por otra parte se ha estudiado el efecto ansiolítico de *S. baicalensis* y *S. lateriflora*, las cuales han sido muy utilizadas para el tratamiento del insomnio, estrés, depresión y epilepsia. A causa del contenido de compuestos químicos como flavonoides en *S. baicalensis*, se ha demostrado que estos compuestos son capaces de unirse a los sitios benzodiazepínicos de los receptores GABA-A, sin presentar los efectos colaterales sedantes ni anticonvulsivantes de las benzodiacepinas como es el caso particular de la wogonina (Awad *et al* ; 2003; Park *et al* 2007). La baicaleina flavonoide extraído de la *S. baicalensis*, posee actividad antidepressiva, evidenciada tras su administración intraperitoneal en ratones, con disminución del tiempo de inmovilidad en los modelos de nado

forzado y suspensión por la cola, como de forma crónica en ratas, con reducción del tiempo de inmovilidad y aumento de la actividad locomotora en un modelo de estrés (Xiong *et al* 2011). El extracto total de *S. baicalensis*, así como los flavonoides extraídos de ella, presentan efecto neuroprotector y antiisquémico (Heo *et al* 2009; Mu *et al*; 2009). El extracto etanólico total de esta planta, entre otros, también mostró efecto neuroprotector, y mejoró significativamente la función cognitiva mediante inhibición de la inflamación, el estrés oxidativo y la neurodegeneración (Lin *et al* 2011). También se ha estudiado las propiedades ansiolíticas de *S. lateriflora*, en humanos y animales de experimentación, atribuyéndose esta actividad principalmente a la presencia de los flavonoides y aminoácidos. Algunos de los flavonoides aislados de la planta son escutelareina e ikonikósido I, los cuales son capaces de unirse al receptor 5-HT7 en el cerebro, este receptor está implicado en la patogénesis y prevención de enfermedades como la depresión, la migraña o trastornos del sueño. La Baicalina y baicaleina, se unen en el lugar de unión de las benzodiazepinas del receptor GABA_A emulando la acción del neurotransmisor GABA principal inhibidor del SNC. Mediante los test habituales de comportamiento, se ha estudiado *in vivo* en ratas el efecto ansiolítico de extractos de *S. lateriflora* administrados por vía oral y en un ensayo clínico doble ciego, controlado frente a placebo, en voluntarios sanos, se ha evidenciado una importante actividad ansiolítica sin signos evidentes de toxicidad ni efectos adversos (Awad *et al* ; 2003).

4.3 Estudios de actividad biológica de *Justicia*

Un efecto importante ocasionado por *J. pectoralis*, es el antioxidante, y se ha demostrado empleando células disgregadas de cerebros de rata, a los cuales se les indujo previamente peroxidación lipídica con hierro/ ascorbato; y posteriormente se llevó a cabo la determinación de malondialdehído (MVA). Los resultados obtenidos manifestaron que los compuestos polifenólicos de *J. pectoralis*, atraparón o secuestraron ERO, radicales lipídicos y formaron radicales polifenólicos más estables, además de quelar iones metálicos. Esto confirma la existencia de las propiedades antioxidantes de *J. pectoralis*, que era de suponer si

se toma en consideración que los metabolitos reportados como mayoritarios son del tipo de compuestos polifenólicos y que una de las actividades más ampliamente encontradas para estos es el efecto antioxidante. Por esta razón los resultados obtenidos durante la autoxidación inducida por el sistema hierro/ascorbato pudieran ser atribuidos a esta propiedad de los compuestos polifenólicos (Pérez *et al* 2001b).

En un estudio se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso y alcohólico de *J. prostrata*, utilizando la inflamación aguda inducida por carragenina en ratas. Simultáneamente, se midieron los niveles de peróxidos lipídicos, alcalinos y fosfatasa ácida. Se encontró que el modelo de edema de la pata de rata inducido con carragenina, tanto para el extracto acuoso como para el alcohólico a una dosis de 500 mg / kg, mostraron inhibición máxima de reducción en el volumen de inflamación de la pata en un 51,39% y 62,5%, de manera dosis-dependiente. El extracto acuoso y alcohólico de *J. prostrata* resultó tener una actividad antiinflamatoria, reduciendo los niveles de peróxido de lípidos en el hígado y exudado, lo cual indica su actividad de captación de radicales libres. En dicho estudio se encontró que el extracto alcohólico fue más eficaz como agente antiinflamatorio que el extracto acuoso. Los autores atribuyeron a los compuestos fenólicos de los extractos, de la actividad antiinflamatoria (Sanmugapriya *et al.*, 2005).

Además se han reportado estudios de actividad hepatoprotectora, del extracto de éter de petróleo de *J. simplex* y lignanos aislados de esta planta. Se determinó el efecto protector sobre hepatotoxicidad inducida por CCl₄ en ratas. La toxicidad inducida por el CCl₄, eleva los niveles de marcador de enzimas alanina, aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, alcalina fosfatasa, y estimula a lo largo la disminución de los triglicéridos con la peroxidación lipídica y el contenido de glutatión. Además esto condujo a cambios funcionales y morfológicos en la membrana celular hepática. El pretratamiento con el extracto y los lignanos aislados a una dosis de 100 mg /kg y 10 mg / kg respectivamente, normalizaron estos niveles tóxicos. Los lignanos aislados en este estudio pertenecen al grupo

metilendioxi, los cuales podrían ser responsables del efecto protector y antioxidante (Jasemine *et al.*, 2007).

Es importante destacar que se ha evaluado el posible efecto tóxico, del extracto *J. pectoralis* en ratas, encontrándose que la administración a una dosis límite de 2000 mg/kg del extracto no provocó muertes en los animales o síntomas indicativos de toxicidad, sin embargo los animales manifestaron síntomas de somnolencia y sedación en los dos primeros días post administración, observándose una rápida recuperación de los animales. Por lo tanto en las condiciones del ensayo no se produjo toxicidad, además los estudios anatomopatológicos macroscópicos no mostraron ninguna alteración en los órganos estudiados (Bermúdez *et al.*, 2006).

Otros estudios sobre este género evidencian la actividad ansiolítica. Por ejemplo el elenosido un compuesto aislado del extracto de *J. hyssopifolia*, ha demostrado una actividad estimulante y depresora del sistema nervioso central en ratas. Su acción ansiolítica, sedante y relajante, es similar a otros medicamentos tranquilizantes, tales como la acción de los barbitúricos sedantes e hipnóticos (Navarro *et al.*, 2004). Así mismo el efecto ansiolítico de los extractos de *J. pectoralis*, *J. aurea*, y *J. albobracteata* fueron confirmados en ensayos *in vitro*. Los resultados establecen que los compuestos químicos en dichos extractos tienen capacidad para inhibir la GABA transaminasa (GABA-T) o para unirse al receptor de benzodiazepina GABA-A, dos de los objetivos principales de las drogas para la epilepsia y la ansiedad. Se observó una correlación positiva significativa entre la inhibición GABA-T y la frecuencia relativa de utilización para la epilepsia. Por otra parte, se observó una correlación más fuerte entre GABA-A vinculante y la frecuencia relativa de utilización para el choque. Así, el conocimiento tradicional de *J. pectoralis*, *J. aurea* y *J. albobracteata* se asocia con actividades antiepilépticas y ansiolíticas (Corrêa y Alcântara, 2012).

4.4 Las plantas como alternativa para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso

En la actualidad la medicina tradicional representa una opción importante de respuesta ante las necesidades crecientes de atención a la salud mental, algunos de estos son productos disponibles como medicinas herbales sicoterapéuticas seguras y con menos efectos secundarios, en comparación a productos terapéuticos convencionales tipo antidepresivos y benzodiacepinas (Sarris *et al*, 2011). A pesar de esto, la medicina herbal en siquiatria está aún en su infancia, aunque en los últimos años ha habido un incremento considerable en la investigación en este campo y los resultados de estudios preclínicos *in vivo* e *in vitro* han validado fitoterapias que tienen una serie de efectos benéficos en casos de ansiedad, alteraciones del estado de ánimo y desórdenes del sueño (De Sousa, 2013).

Tradicionalmente (Lúpulo) *Humulus lupulus*, (Calderona amarilla) *Galphimia glauca*, (Gotu kola) *Centella asiática*, (Virginia) *Scutellaria lateriflora*, (chirimoya) *Annona cherimolia*, (Valeriana) *Valeriana officinalis*; son especies que han sido empleadas por sus propiedades ansiolíticas y sedantes, cuya seguridad y eficacia han sido demostradas experimentalmente, a través de ensayos preclínicos empleando modelos animales. Confirmado que la actividad y mecanismo de acción de dichas plantas esta mediado por los sistemas de neurotransmisión GABAérgico, noradrenérgico, serotoninérgico, dopaminérgico, glutamatérgico y monoaminérgico (Sollozo *et al*, 2011).

En la actualidad las referencias sobre estudios clínicos en plantas con propiedades ansiolíticas son escasas. Sin embargo, se han reportado ensayos empleando aceite esencial de (lavanda) *Lavandula angustifolia*. Así, en una experiencia realizada sobre un reducido grupo de mujeres jóvenes, se ha podido observar que la exposición al aroma del aceite esencial de lavanda produce un incremento en el tono parasimpático, con disminución en la relación entre la frecuencia cardíaca alta y baja, además de una activación metabólica de

determinadas regiones cerebrales, tales como la orbitofrontal, tallo cerebral, tálamo y cerebelo, según ha podido ser establecido mediante PET (tomografía de emisión de positrones); estos datos son indicativos de un efecto ansiolítico (Duan *et al*, 2007). En otro ensayo clínico, realizado al igual que el anterior sobre un bajo número de participantes que fueron expuestos al aroma de lavanda, los datos electroencefalográficos mostraron un incremento en la actividad del lóbulo frontal izquierdo, hecho que se asocia a una disminución del estado depresivo y a una conducta positiva. Por otra parte se observó un incremento en las ondas β , característico de un aumento en la percepción en el procesamiento de la información, así como de las ondas ϑ (teta), cuyo aumento está relacionado con el estado de relajación (Sanders, *et al* 2002).

También se han realizado ensayos clínicos para confirmar la actividad ansiolítica y sedante de (Melisa) *Melissa officinalis*. En un ensayo participaron 72 pacientes afectados de demencia con agitación clínicamente significativa. Estos pacientes se trataron con una loción que contenía 10% de esencia de melisa, aplicada por vía tópica, dos veces al día. Después de 4 semanas de tratamiento, se demostró que en los pacientes tratados con melisa disminuyó de forma significativa su agitación y mejoró su calidad de vida; reducción del tiempo de alejamiento social e incremento del tiempo invertido en actividades constructivas (Ballard, *et al* 2002). En otro ensayo se valoró la eficacia de melisa frente al estrés psicológico de grado moderado inducido experimentalmente. Este estudio puso de manifiesto que una dosis única de extracto de melisa (600 mg) es capaz de mitigar el estrés de forma significativa y mejorar el estado de ánimo de los pacientes (Kennedy *et al* 2004).

Finalmente la información etnobotánica constituye una solución para los problemas de salud de las personas que sufren estados alterados del ánimo; esto se ha visto reflejado en el creciente número de productos herbáceos que han sido introducidos en la práctica psiquiátrica, los cuales han demostrado ser más eficaces y mejor tolerados, cuyo potencial terapéutico ha sido corroborado en la mayoría de los casos a nivel científico (Zhang, 2004 b).

4.5 Evaluación de la actividad citotóxica de plantas medicinales empleando cultivos *in vitro* de linfocitos humanos

A pesar de la importancia de la información recopilada sobre la actividad biológica de los géneros *Scutellaria* y *Justicia*, no existen estudios que evalúen la actividad biológica de *S. incarnata*; y en cuanto a *J. pectoralis* dichos estudios son escasos. Más aun, no existen reportes de estudios que evalúen la actividad citotóxica *in vitro* de sus extractos. No obstante existen estudios de citotoxicidad con extractos de otras plantas sobre linfocitos humanos.

Ciertos estudios de citotoxicidad de extractos de plantas se basan en técnicas, que permiten examinar muchas propiedades de un gran número de células en poco tiempo a través del método de citometría de flujo, o analizan una proporción celular en cualquier fase de la mitosis dentro de una población celular determinada por medio de la técnica de medición del ciclo celular o el índice mitótico.

Así en estudios de citotoxicidad el extracto de *Crescentia cujete* (Totumo) fue evaluado en dosis experimentales de 10,25, 82, 1000µg/mL, sobre linfocitos humanos cultivados *in vitro* mediante análisis de índice mitótico y citometría de flujo. Los resultados mostraron que el extracto total de *C. cujete* ejerció un efecto apoptótico, sobre las células mononucleares tratadas *in vitro*, característica presente en la mayoría de agentes anticancerígenos que se emplean en tratamientos médicos. La citotoxicidad encontrada para dicho extracto en linfocitos humanos, se atribuyó a la presencia de compuestos fenólicos tales como flavonoides y taninos estaría implicada en la capacidad de inhibir o bloquear el ciclo celular y posiblemente causar muerte celular. (Solarte and Vásquez, 2012).

Resultados similares reportaron Barbosa y Arias (1995) cuando evaluaron los extractos de plantas medicinales *Curatella americana*, *pantacalia vaccinoides*, *Thevetia neriifolia*, *Bidens pilosa*, *Viburnum toronis*, sobre linfocitos humanos. Encontrando fenómenos como muerte celular, malformaciones celulares y cromosómicas dependiente de la concentración.

No obstante un estudio realizado con el extracto de *Aloe vera*, se demostró que no presenta actividad citotóxica sobre los linfocitos cultivados *in vitro*. Los resultados arrojados indicaron que no hubo un cambio significativo del índice mitótico con respecto al incremento de las concentraciones de 1 y 2mg/mL. En la prueba de genotoxicidad el extracto de *Aloe vera* a altas concentraciones de 2mg/mL no generó daños significativos a nivel cromosómico (Ordoñez, 2009).

Otro tipo de estudios realizados con linfocitos, consisten en evaluar si los compuestos de origen vegetal producen disminución de la viabilidad celular empleando métodos colorimétricos de la reducción de la resazurina o MTT. En un estudio reciente se evaluó la actividad citotóxica del extracto de *Lantana grisebachii*, en concentraciones de 100 μ g/mL sobre linfocitos humanos de sangre periférica cultivados *in vitro*, mediante el método de reducción de la resazurina. Los resultados obtenidos mediante este estudio muestran, que el extracto de *L. grisebachii*, no ejerce un efecto citotóxico sobre los linfocitos. Esto podría estar relacionado con compuestos como flavonoides y ácidos fenólicos (clorogénicos) los cuales ejercen una acción inmunoreguladora y antioxidante. Además los efectos beneficiosos del extracto de *L. grisebachii*, fueron comprobados al tratar linfocitos cultivados *in vitro* con arsénico, demostrando que los fitoquímicos presentes en la planta *L. grisebachii* ejercen un efecto de antioxidación y citoprotección a los linfocitos expuestos a arsénico. Esto apoya que algunos fitofármacos pueden estimular las vías moleculares de protección (Soria, *et al* 2014).

El efecto citotóxico también fue evaluado en el compuesto acetato de longipilina, aislado de la planta *Espeletia killipii*, en dosis experimentales de 3 μ g/mL sobre linfocitos humanos cultivados *in vitro* mediante el ensayo colorimétrico de proliferación celular de MTT. Los resultados obtenidos demostraron que no hubo un efecto citotóxico importante a concentraciones \leq de 12.5 μ g/mL, por presentar porcentajes de viabilidad superiores al 80%. Caso contrario manifestaron células tumorales expuestas al principio activo de *Espeletia killipii*. Por lo tanto el compuesto acetato de longipilina afecta principalmente a los grupos celulares

indiferenciados y aumenta cuando su potencial mitótico es mayor (Jaimes, 2006). Esto concuerda con estudios publicados con sesquiterpenlactonas similares como acetato de ivalina con actividad antileucémica importante y baja toxicidad sobre células mononucleares de sangre periférica (Quintero *et al.*, 1999).

De modo semejante, se ha estudiado la actividad citotóxica de los extractos de, *Garcinia indica*, *Phyllanthus niruri*, y *Coleus aromaticus*, mediante el método de reducción de MTT y azul de trypan. Los cultivos de linfocitos fueron tratados con concentraciones de 50, 100 o 200 g / ml de los extractos de dichas plantas. En el presente estudio se encontró que los extractos *A. indica*, *C. aromaticus*, *P. niruri* fueron citotóxicos para los linfocitos. Por ejemplo se ha indicado que *P. niruri*, contiene principalmente lignanos, alcaloides y bioflavonoides los cuales serían los responsables de dicha actividad y por lo tanto su uso medicinal debe ser controlado (Varalakshmi, *et al* 2011).

Considerando la elevada demanda en el uso de plantas medicinales es necesario producir evidencia científica sobre la seguridad y eficacia de los productos que consumen empíricamente las personas, en las cuales la medicina tradicional está muy arraigada.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Determinar la actividad citotóxica *in vitro* sobre linfocitos humanos de extractos de *S. incarnata* y *J. pectoralis* como parte de los estudios de actividad biológica requeridos para certificar su uso como fitoterapéuticos.

5.2 Objetivos específicos:

- Determinar si la sobrevivencia de los linfocitos humanos es afectada por la concentración de los extractos vegetales y el tiempo de exposición a estos.
- Recomendar una dosis de los extractos vegetales para el consumo humano a través de la determinación de Concentración Inhibitoria 50 (CI50), sobre linfocitos.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 PROCEDENCIA DEL MATERIAL VEGETAL

Las especies *S. incarnata* y *J. pectoralis* fueron colectadas en la vereda La Palomera ubicada en el municipio de Santander de Quilichao, departamento del Cauca. A una altura de 1.071 m.s.n.m y una Temperatura Promedio: 23° C.

Las plantas se recolectaron por conveniencia, es decir recolectado las hojas, flores y tallos sanos de las plantas en buen estado fisiológico, que no presentaran deterioro, ya sea por hongos o insectos, en el momento de la colecta. Posteriormente se realizó el lavado con agua destilada y secado del material vegetal en la incubadora a 35°C en el laboratorio. Después de secar el material se trituro y se empaco en bolsas de polietileno herméticas.

Figura 4. A. Lugar de muestreo y colecta del material vegetal. Vereda la Palomera, municipio de Santander de Quilichao departamento del Cauca. A. Cultivo de *J. pectoralis* B. Cultivo de *S. incarnata*.



6.2 OBTENCION DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

Se obtuvieron extractos etanólicos de partes aéreas de las plantas *S. incarnata* y de *J. pectoralis*, elaborados por el grupo de química de productos naturales – QPN, de la Universidad del Cauca, mediante el método por arrastre de vapor o extracción soxhlet, este método consiste en colocar el material a extraer previamente molido y pesado, en un cartucho de celulosa que se introduce en la cámara de extracción conectada, por una parte, a un balón de destilación y por otra, a un refrigerante. El disolvente contenido en un balón se calienta a ebullición, el vapor asciende por el tubo lateral y se condensa en el refrigerante, cayendo sobre el material. Cuando alcanza el nivel conveniente sifona por el tubo regresando al balón. El proceso se repite hasta conseguir el agotamiento deseado del material (Vásquez *et al*, 2001). Los extractos obtenidos se liofilizaron por un método que consistió en congelar el material vegetal para posteriormente introducirlo en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se eliminó el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. Luego se trataron con carbón activado para retirar el color sin afectar el principio activo. El material seco se guardó asépticamente a 4° C. (Jennings, 1993).

6.3 ESTUDIO DE ACTIVIDAD CITOTOXICA

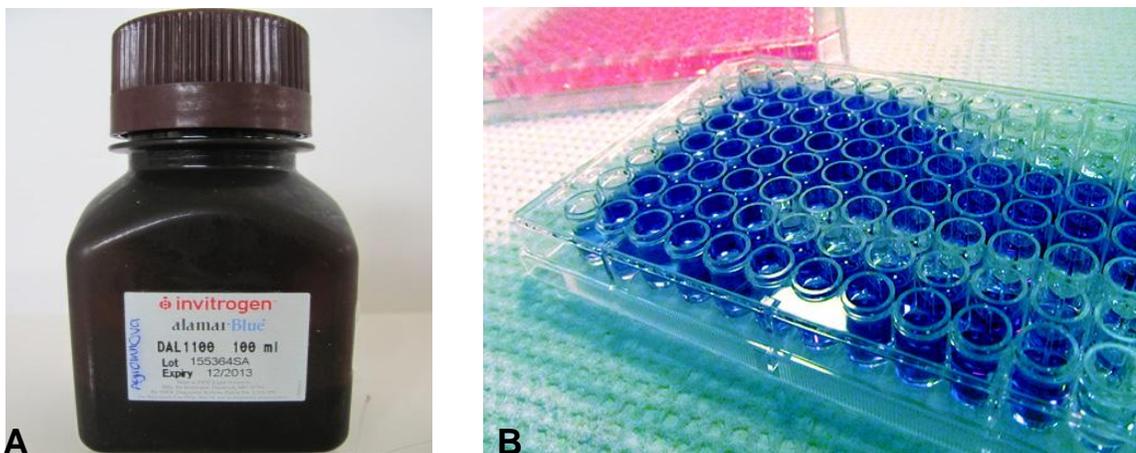
Todos los procedimientos descritos a continuación se realizaron en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Facultad de Salud de la Universidad del Cauca, siguiendo los protocolos recomendados en el manual del producto Alamar Blue para determinar la citotoxicidad de una sustancia .

6.3.1 Determinación de la calidad de alamar Blue ®

La casa comercial que vende el producto AlamarBlue, invitrogen, sugiere determinar los valores de absorbancia esperados del Alamar Blue oxidado y reducido para las condiciones experimentales de una investigación en particular. Se agregaron 10 µL de Alamar Blue en medio de cultivo RPMI en un tubo falcón. Esta preparación se redujo en autoclave, se retiró y dejó enfriar a temperatura

ambiente. Finalmente se agito la solución con una pipeta y se sirvió en los pocillos de una placa de microtitulación de fondo plano, se midió la absorbancia en un equipo de microelisa RT 2100 marca Rayto en longitudes de onda a 570 nm y 630 nm para obtener los promedios correspondientes (Elloyd, 2002).

Figura 5. A. Alamar Blue B. Reactivo Alamar Blue en la forma oxidada (azul) y reducida (rojo).



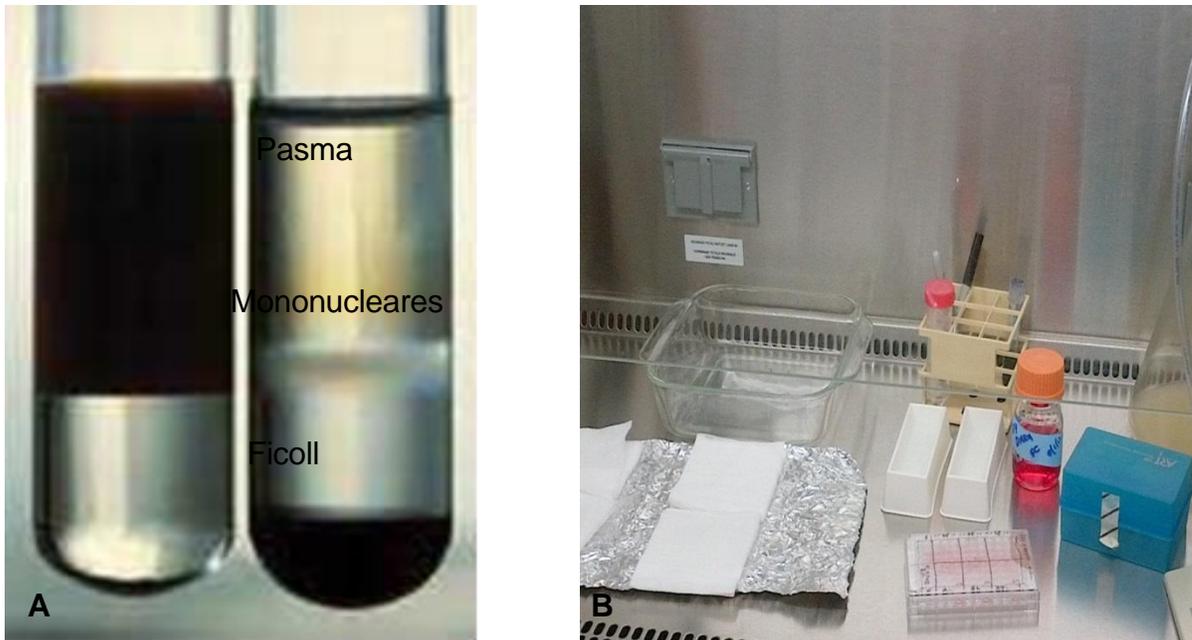
6.3.2 Extracción y cultivo de linfocitos

Para aislar linfocitos se obtuvo una muestra de 5 mL de sangre en un tubo heparinizado, de 1 hombre y 1 una mujer sanos entre 18 y 25 años de edad, que no recibieran tratamiento médico y que no consumieran tabaco, bebidas alcohólicas y drogas psicoactivas con previo consentimiento informado. La extracción de los linfocitos se hizo mediante el método de Ficoll-Hypaque (Mishell and Shiigi, 1980).

La muestra de sangre fue resuspendida 1/2 volumen con PBS, en un falcón de 15ml, la sangre se transfirió cuidadosamente sobre medio volumen de Ficoll-Hypaque, evitando que la sangre y el medio de separación se mezclaran. Se centrifugo a 2500 rpm por 25 min a temperatura ambiente. Se recogió la banda de células mononucleares y finalmente se realizaron dos lavados a las células con 2mL

de la misma solución salina; centrifugando a 2500 rpm por 5 min, seguidamente se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1mL de medio RPMI.

Figura 6. A. Distribución de los componentes sanguíneos en el gradiente de ficoll-Hypaque después de centrifugar. B. Cámara de flujo laminar con los implementos de laboratorio.



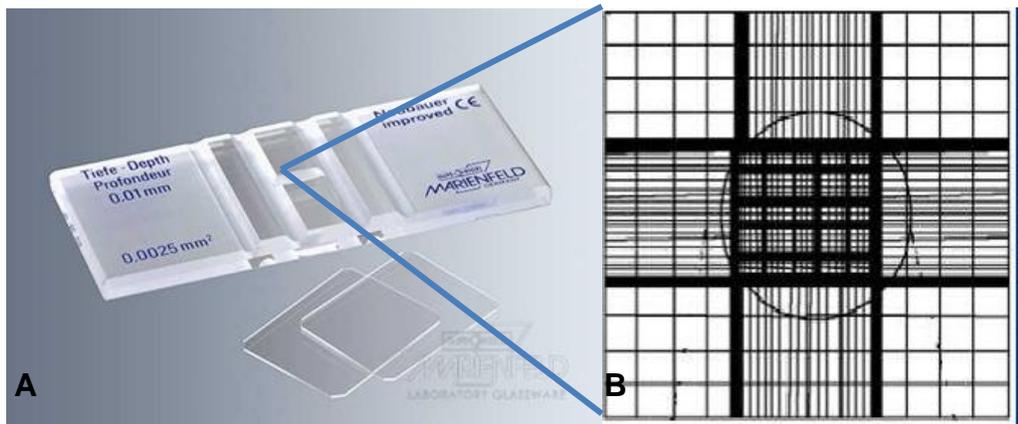
Las células fueron contadas en cámara de Neubauer. Para realizar el conteo, se sacaron 10 μ l de la suspensión que contenía las células en un pozo de una placa de Elisa y se adicionaron 10 μ l de azul de tripano al 0.4 %, el cual tiñe las células muertas de azul. Luego de cubrir el hemocitómetro con el cubreobjetos, se adiciono con una micropipeta 10 μ l de la suspensión teñida a cada una de las cámaras y se dispuso a contar todas las células vivas y muertas en cada uno de los cuatro cuadrados usando el objetivo 10 X de un microscopio óptico. Se determinó la cantidad de células en suspensión, calculando el número total de células, contadas en los 4 cuadrados, aplicando la fórmula del cálculo de concentración celular (Hokland and Heron, 1980).

Figura 7: Fórmula para calcular la concentración celular

$$\text{Concentración (cel/ml)} = \frac{\text{Número de células contadas en los 4 cuadros}}{\text{Numero de cuadros}} \times 10.000$$

Para realizar la siembra de linfocitos, se calculó la cantidad de células contenidas en un volumen de 1 mL, mediante conteo de cámara de Neubauer, conociendo el total de células, se halló el volumen necesario para sembrar una densidad igual en cada pozo.

Figura 8. A. Cámara de Neubauer B. Vista de los cuadrantes de la cámara de Neubauer para realizar el conteo celular.



6.3.3 Determinación de la longitud del tiempo de incubación y la densidad optima de linfocitos

De acuerdo con el manual de invitrogen, para el correcto funcionamiento del Alamar se debe establecer la cantidad de células a sembrar y el tiempo de incubación de estas con el colorante. Por lo tanto, se aislaron los linfocitos de sangre periférica y se calculó la cantidad de células mediante conteo de cámara de Neubauer, conociendo la concentración de células en la solución, se determinó el volumen necesario para sembrar células en los diferentes pozos en las siguientes cantidades: 100.000, 200.000, 300.000, 400.000, el volumen final se ajustó a 100 μ L, simultáneamente se adicono AlamarBlue al 10%, se incubó a 37

°C y 5 % de CO₂. Las células se cultivaron en placas de cultivo de 96 pozos con medio RPMI, suplementado con 5% de suero fetal bovino, penicilina 100 U/mL y estreptomicina a 100 mg/mL. Se realizaron tres mediciones de absorbancia a las 4 horas, 8 horas y 24 horas en longitudes de onda de 570 nm y 600 nm.

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de reducción mediante la fórmula (Fig. 9), se determinó el tiempo y la cantidad de células necesarias para que el indicador cambiara de la forma oxidada (azul) a la forma reducida (rojo) (Elloyd, 2002).

Figura 9: Fórmula para calcular el porcentaje de reducción

$$\text{Porcentaje de reducción} = \frac{O2 * A1 - (O1 * A2)}{R1 * N2 - (R2 * N1)} * 100$$

O2: 34798 coeficiente molar de extinción de AlamarBlue oxidado a 570nm

O1: 80586 coeficiente molar de extinción de AlamarBlue oxidado a 630nm

R1: 155677 Promedio de absorbancia de los datos obtenidos de AlamarBlue reducido a 570nm

R2: Promedio de absorbancia de los datos obtenidos de AlamarBlue reducido a 630nm

N1: Promedio de absorbancia del control negativo (RPMI+ AlamarBlue) a 570nm.

N2 Promedio de absorbancia del control negativo (RPMI+ AlamarBlue) a 630nm.

6.4 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD

6.4.1 Siembra de linfocitos

Una vez aislados los linfocitos a partir de las muestras de sangre se sembraron a una densidad de 200.000 células/ pozo en placas de microelisa en volumen final de 100 µL.

Los cultivos de linfocitos se sembraron en medio de cultivo RPMI en placas de 96 pozos durante 24 horas a una temperatura de 37° C y 5% de CO₂ en aire y 95% de humedad relativa.

4.4.2 Adición de tratamientos y AlamarBlue®

Se preparó una solución stock de los extractos de *S. incarnata* y *J. pectoralis* a una concentración de 2.5 g/mL diluidos en DMSO al 40%. A partir de esta concentración se prepararon 6 soluciones seriadas del extracto de *S. incarnata* con las siguientes concentraciones finales: 25.000 µg/mL, 10.000 µg/mL, 5.000 µg/mL, 4.000 µg/mL, 3.000 µg/mL, 2.000 µg/mL, y se prepararon 5 soluciones seriadas del extracto de *J. pectoralis* a concentraciones de 7.200 µg/ML, 5.000 µg/ML, 4.000 µg/ML, 3.000 µg/ML, 2.000 µg/ML (**Tabla 1**). La concentración más alta corresponde a la dosis de 30 gotas de los extractos consumidos por las personas como tratamiento para el trastorno del estado anímico quienes reportaron mejoría, sin efectos secundarios.

Se evaluó inicialmente el efecto del DMSO empleado como solvente, a concentraciones de 0,4% y 0,5%. La mayor concentración de los extractos corresponde a una concentración de DMSO igual a 0,4 %, adicionalmente se evaluó una concentración mayor con en el fin de determinar si este compuesto ejerce un efecto citotóxico en las células.

Posterior a la evaluación del DMSO se procedió a evaluar el efecto de los extractos vegetales sobre los linfocitos. En cada experimento se usó como control positivo medio de cultivo con linfocitos y mitomicina a 100 µg/mL (**Tabla 1**).

Una vez adaptados los cultivos celulares, durante 24 horas, se adicionaron los tratamientos, simultáneamente se adicionó a los pozos 10 µL del reactivo AlamarBlue (resazurina) de Gibco. Las microplacas de cultivo se incubaron hasta 48 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad y se realizaron dos lecturas de absorbancia una a las 24 horas y otra a las 48 horas.

Figura 10. Células en microplacas de cultivo en medio RPMI tratadas con extractos de las plantas *S. incarnata* y *J. pectoralis* en las diferentes concentraciones evaluada.

B	c	c	2	1	5	4	3	2	N
l	o	o	5	0	0	0	0	0	o
a	n	n	0	0	0	0	0	0	r
n	t	t	0	0	0	0	0	0	m
c	r	r	0	0					a
o	o	o							l
	l	l							e
	+	-							s

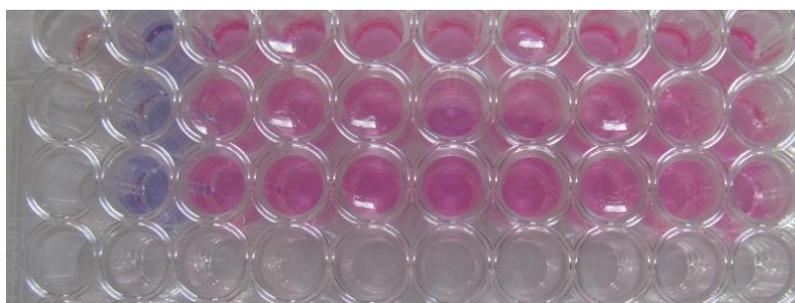


Tabla 1. Diseño General para los ensayos de Citotoxicidad

<i>S. Incarnata</i>										
T1	T0	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
	T0	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
	T0	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
<i>J. Pectoralis</i>										
	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16			
	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16			
	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16			

T1: Blanco Medio de Cultivo RPMI sin linfocitos

T2 : Control positivo (Linfocitos en medio RPMI + Mitomicina)

T0: Control Negativo (Linfocitos en medio RPMI+ DMSO + AlamarBlue)

T3: Linfocitos en Medio RPMI

T4: Linfocitos en medio RPMI + extracto de *S. Incarnata* a 25.000 µg/ML

T5: Linfocitos en medio RPMI + extracto de *S. Incarnata* a 10.000 µg/ML
T6: Linfocitos en medio RPMI + extracto de *S. Incarnata* a 5.000 µg/ML
T7: Linfocitos en medio RPMI + extracto de *S. Incarnata* a 4.000 µg/ML
T8: Linfocitos en medio RPMI + extracto de *S. Incarnata* a 3.000 µg/ML
T9: Linfocitos en medio RPMI + extracto de *S. Incarnata* a 2.000 µg/ML
T10: Linfocitos en medio RPMI + extracto de *J. Pectoralis* a 25.000 µg/ML
T11: Linfocitos en medio RPMI + extracto de *J. Pectoralis* a 10.000 µg/ML
T12: Linfocitos en medio RPMI + extracto de *J. Pectoralis* a 7.200 µg/ML
T13: Linfocitos en medio RPMI + extracto de *J. Pectoralis* a 5.000 µg/ML
T14: Linfocitos en medio RPMI + extracto de *J. Pectoralis* a 4.000 µg/ML
T15: Linfocitos en medio RPMI + extracto de *J. Pectoralis* a 3.000 µg/ML
T16: Linfocitos en medio RPMI + extracto de *J. Pectoralis* a 2.000 µg/ML

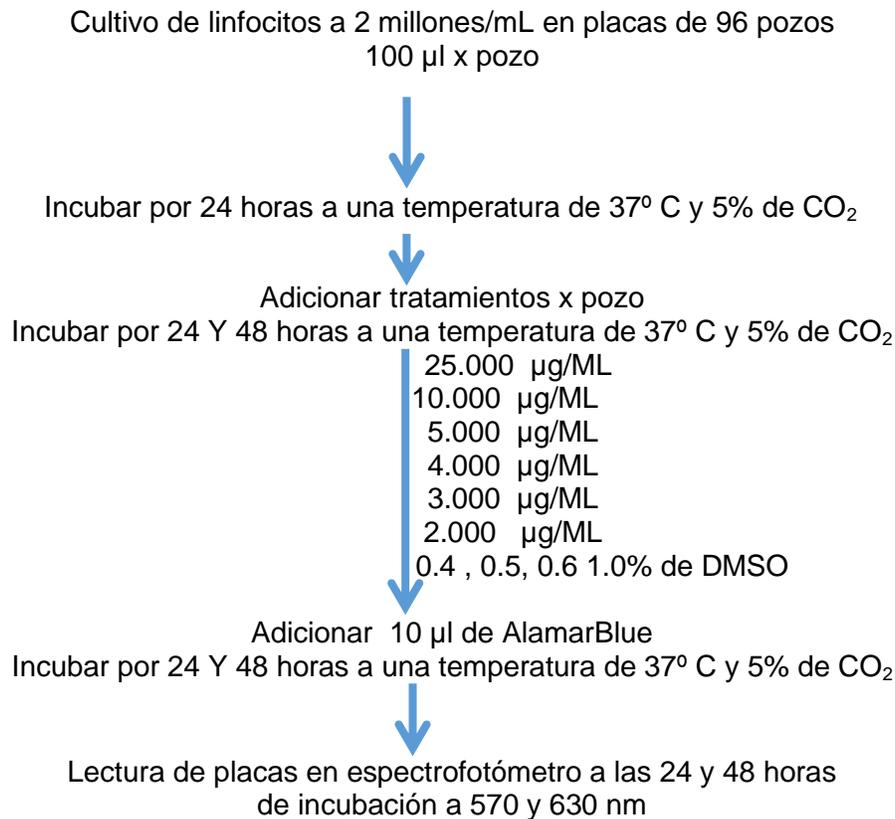
Los controles y tratamientos se evaluaron por triplicado, bajo un diseño experimental completo al azar en dos fechas diferentes para evaluar la repetibilidad de los experimentos.

6.4.3 Lecturas de absorbancia

Transcurridas 24 y 48 horas de incubación de los cultivos tratados, la absorbancia fue leída a 570nm y 630nm en un equipo de microelisa RT 2100 marca Rayto.

Los valores de absorbancia, fueron transformados a porcentajes de supervivencia y graficados versus la concentración de los tratamientos. Para calcular la concentración inhibitoria 50 se buscó la concentración que produjera un porcentaje de supervivencia igual al 50%.

Figura 11. Esquema general para evaluar el efecto de los extractos de *S. incarnata* y *J. pectoralis*, sobre la viabilidad de linfocitos humanos.



6.5 ANALISIS ESTADISTICO

Como variable de respuesta se obtuvieron absorbancias de los controles y tratamientos a 570nm y 630nm. Con base en los valores de absorbancia obtenidos se calculó el porcentaje de sobrevivencia celular entre los linfocitos sometidos a tratamientos y los linfocitos/ en crecimiento normal, con la siguiente fórmula (Figura 12):

$$\text{Porcentaje de sobrevivencia} = \frac{O2 \cdot A1 - (O1 \cdot A2)}{O2 \cdot N1 - (O1 \cdot N2)} * 100$$

O2: 34798 coeficiente molar de extinción de AlamarBlue reducido a 570nm

O1: 80586 coeficiente molar de extinción de AlamarBlue oxidado a 630nm

A1: Promedio de absorbancia de los datos obtenidos de AlamarBlue reducido a 570nm

A2: Promedio de absorbancia de los datos obtenidos de AlamarBlue reducido a 630nm

N1: Promedio de absorbancia de los datos obtenidos de células sin tratamiento reducidas con AlamarBlue 570nm.

N2: Promedio de datos obtenidos de células sin tratamiento reducidas con AlamarBlue 630nm.

Los datos de porcentaje de sobrevivencia obtenidas fueron tabulados y analizados mediante el programa SPSS versión 21. Se realizó un análisis preliminar, que incluyo pruebas de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (prueba Levene). Como los datos de sobrevivencia de los linfocitos expuestos a diferentes concentraciones de *S. incarnata* y *J. pectoralis* cumplieron con los parámetros de normalidad y homogeneidad de varianza se empleó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias entre las respuestas de las células a los tratamientos, es decir si existían diferencias entre la sobrevivencia de las células en crecimiento con medio de cultivo y DMSO, y la sobrevivencia de las células en presencia de los extractos vegetales, es decir si los extractos presentaban un efecto citotóxico.

El análisis de los datos se realizó con un intervalo de confianza del 99% o probabilidad de error ($p < 0,01$).

7. RESULTADOS

7.3.1. Determinación de la calidad de alamar Blue ®

Los resultados de valores de absorbancia para la forma oxidada y reducida del Alamar Blue, en medio RPMI, fueron comparados con los valores de absorbancia que reporta el manual de Alamar Blue (Tabla 2 y 3).

	Absorbancia	
	570	630
Alamar blue+ RPMI oxidado	0,472	0,234
Alamar blue+ RPMI Reducido	0,732	0,135

Tabla 2: Valores promedio de absorbancia obtenidos de alamar blue oxidado y reducido.

	Absorbancia	
	570	630
Alamar blue+ RPMI oxidado	0,659	0,248
Alamar blue+ RPMI Reducido	1,250	0,101

Tabla 3: Valores de absorbancia reportados en literatura de la forma oxidada y reducida de alamar blue.

La tendencia de los valores obtenidos a una absorbancia de 570 y 630 nm con los que reporta invitrogen son similares (figura 13) y mantienen una relación casi igual 1.6 ($0.735 \div 0.464$) vs 1.9 ($1.250 \div 0.659$). Las variaciones obtenidas están ligadas a condiciones experimentales que difieren entre laboratorios, relacionada ciertamente con el espectrofotómetro empleado y la manipulación de diferentes placas de microelisa. Estos resultados son importantes para determinar los valores de absorbancia esperados del de alamar Blue oxidado y reducido, para las condiciones experimentales de esta investigación.

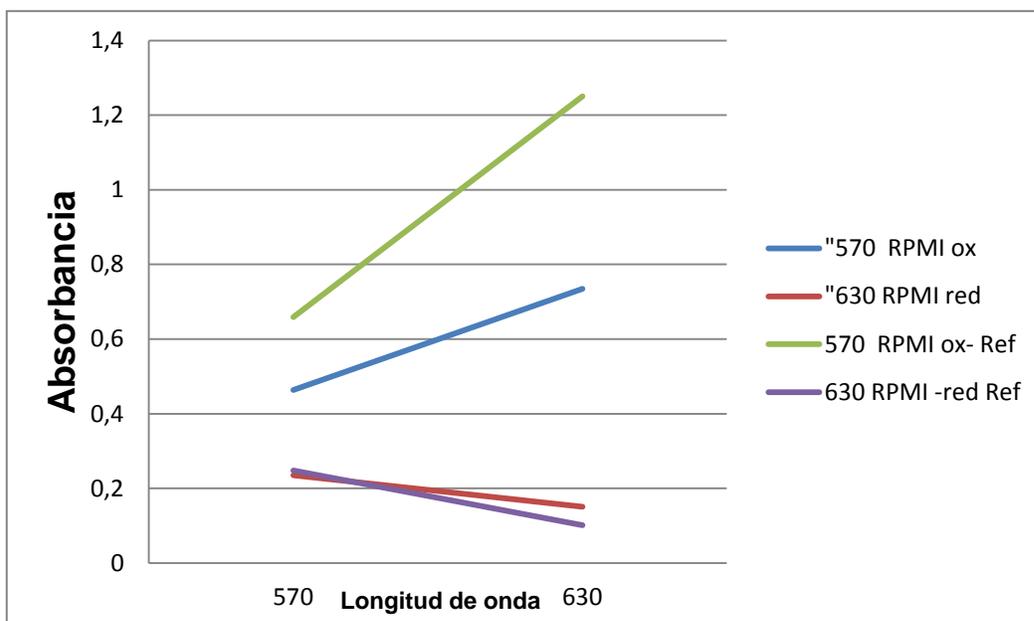


Figura 13: Valores de Absorbancia obtenidos de Alamar blue oxidado a 570 nm y reducido 630 nm y valores de absorbancia reportados en la literatura de la forma oxidada a 570 nm y reducida 630 nm (570 RPMI oxi-ref y 630 RPMI oxi-ref).

7.3.2 Extracción y cultivo de linfocitos

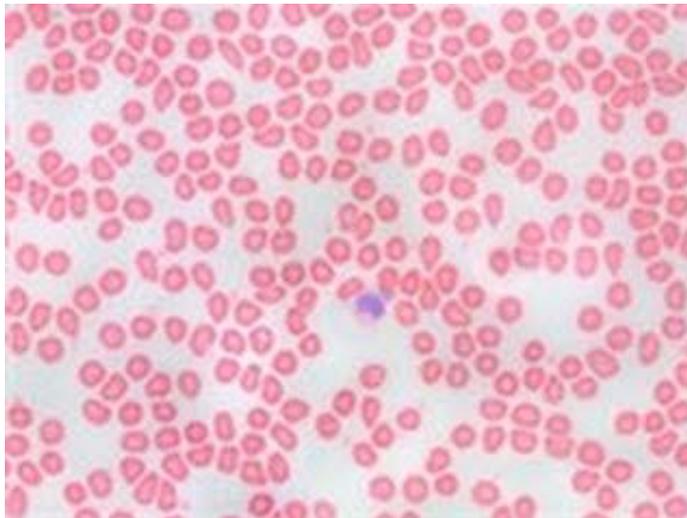
La técnica de ficoll-Hypaque, se basa en una metodología que permite el aislamiento de más del 90% de los linfocitos, con una viabilidad mayor del 90%. En las extracciones se lograron conteos entre 2'000.000 y 6'500.000 cél/mL. Estas células pueden incluir tanto monocitos como linfocitos, pero según Lomote

(2009) los primeros superan ampliamente en número a los segundos, como se observa en la Tabla 4.

Linfocitos: >90% de las células de la fracción obtenida
>90% viabilidad
50 ± 15% rendimiento (recuperación de linfocitos de la muestra)

Otras células: <5% granulocitos
<10% eritrocitos
Plaquetas en cantidades bajas

Figura 14. Linfocitos observados a través de microscopio Nikon con un objetivo de (10X).



7.3.3 Determinación de la longitud del tiempo de incubación y la densidad óptima de linfocitos

En la figura 15 se observa que a las 24 horas el porcentaje máximo de reducción del Alamar blue se obtuvo a una densidad de 300.000 células/ pozo, mientras que a las 48 horas el porcentaje máximo de reducción fue igual a densidades de 100.000, 200,000 y 300,000.

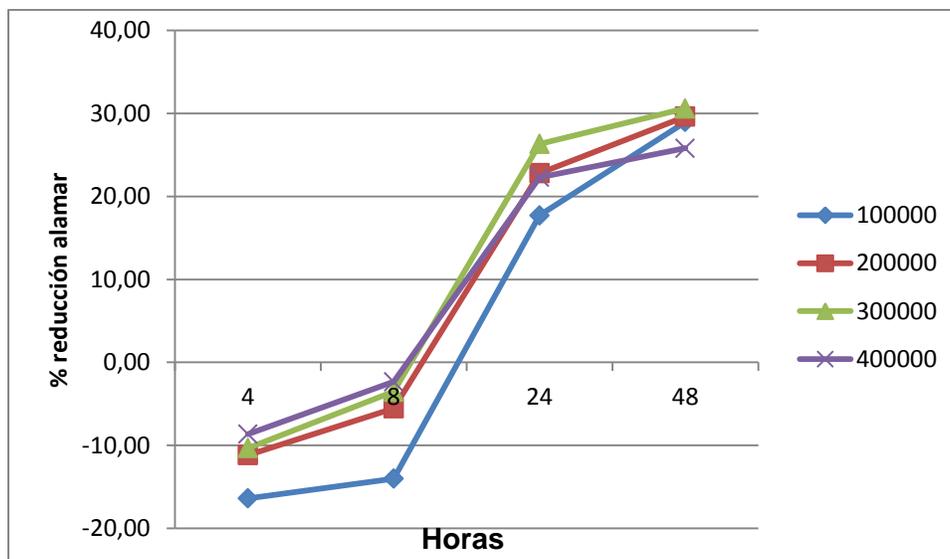


Figura 15. Porcentaje de reducción de alamar Blue versus horas de incubación, a densidades celulares de 100.000, 200.000, 300.000, 400.000 células/ pozo.

Con base en esto se seleccionó la densidad de 200.000 células/ pozo, debido a que en experimentos realizados anteriormente, a densidades mayores las células comenzaron a presentar inactivación celular a las 48 horas de incubación, a causa de que las células dispuestas en cada pozo van proliferando hasta alcanzar una densidad de saturación, pasado esta etapa el crecimiento se detiene por inhibición por contacto y las células comienzan a decrecer y morir.

7.4 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD

Sobre los linfocitos humanos se utilizó el agente antineoplásico mitomicina como control positivo de citotoxicidad, mostrando un descenso en el porcentaje de supervivencia, con valores entre 29,6 % y 14,6 %. Lo que confirma su utilidad como reactivo biológico en estas valoraciones. Los resultados con el control positivo (mitomicina C) no se incluyeron en el análisis estadístico.

Con relación al DMSO empleado como solvente de los extractos de las plantas, se encontró que no afectó la viabilidad de los linfocitos a concentraciones de 0,4 y 0,5%, ya que los valores de supervivencia promedio fueron $(105,19 \pm 19,68)$ y $(95,01 \pm 0,65)$ respectivamente. Lo que indica que la actividad biológica que se

encuentre al evaluar los extractos vegetales será ocasionada únicamente por los compuestos activos que estos contengan y no por acción del solvente (DMSO).

En cuanto a la actividad citotóxica de los extractos de *S. incarnata* y *J. pectoralis*, el análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre los valores de porcentaje de sobrevivencia de los linfocitos sometidos a las diferentes concentraciones evaluadas cuando se realizó un análisis del total de los datos, lo que significa que los extractos no resultaron ser citotóxicos para los linfocitos humanos (Tabla 5 y 6)

Tabla 5. Porcentaje de sobrevivencia de linfocitos humanos tratados con las ocho concentraciones de *J. pectoralis* y el control negativo (DMSO). El promedio comprende dos repeticiones.

<i>J. pectoralis</i>	Tiempo (horas)	Sobrevivencia Célular	p
		Media \pm SD	
dms0	24	100 \pm 0,00	0,262
	48	100 \pm 0,00	0,961
2 μ g/mL	24	100,78 \pm 1,44	0,262
	48	83,85 \pm 21,29	0,961
3 μ g/mL	24	106,86 \pm 15,51	0,262
	48	91,19 \pm 24,47	0,961
4 μ g/mL	24	102,72 \pm 12,10	0,262
	48	88,99 \pm 30,12	0,961
5 μ g/mL	24	114,58 \pm 12,09	0,262
	48	100,39 \pm 32,27	0,961
10 μ g/mL	24	116,25 \pm 16,04	0,262
	48	97,81 \pm 30,22	0,961
7,2 μ g/mL	24	117,64 \pm 25,28	0,262
	48	96,03 \pm 36,31	0,961
25 μ g/mL	24	116,57 \pm 21,45	0,262
	48	90,57 \pm 28,86	0,961

Tabla 6. Porcentaje de sobrevivencia de linfocitos humanos tratados con las siete concentraciones de *S. incarnata* y el control negativo (DMSO). El promedio comprende dos repeticiones.

<i>S. incarnata</i>	Tiempo (horas)	Sobrevivencia Célular	p
		Media \pm SD	
dms0	24	100 \pm 0,00	0,886
	48	100 \pm 0,00	0,310
2 μ g/mL	24	106,71 \pm 17,42	0,886
	48	91,26 \pm 13,99	0,310
3 μ g/mL	24	108,91 \pm 8,22	0,886
	48	89,25 \pm 15,82	0,310
4 μ g/mL	24	102,74 \pm 6,16	0,886
	48	89,96 \pm 16,53	0,310
5 μ g/mL	24	109,55 \pm 11,61	0,886
	48	88,24 \pm 15,02	0,310
10 μ g/mL	24	105,38 \pm 17,94	0,886
	48	88,87 \pm 10,96	0,310
25 μ g/mL	24	105,55 \pm 19,25	0,886
	48	77,95 \pm 18,44	0,310

En la figura 16 se representan los valores de sobrevivencia obtenidos para las diferentes concentraciones de *S.incarnata* en dos experimentos independientes. El valor calculado promedio de sobrevivencia en la primera repetición fue de $(91,13\% \pm 17,09)$ y en la segunda repetición $(103,78 \pm 11,32)$. El valor individual más alto se encontró en la segunda repetición, presentando un porcentaje de sobrevivencia de $(112\% \pm 6,73)$ a una concentración de 2000 $\mu\text{g}/\text{ML}$ y el valor mínimo fue de $(78\% \pm 30,25)$ a una concentración de 25,000 $\mu\text{g}/\text{ML}$. Estadísticamente se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de sobrevivencia de las células respecto al control, en dos repeticiones independientes.

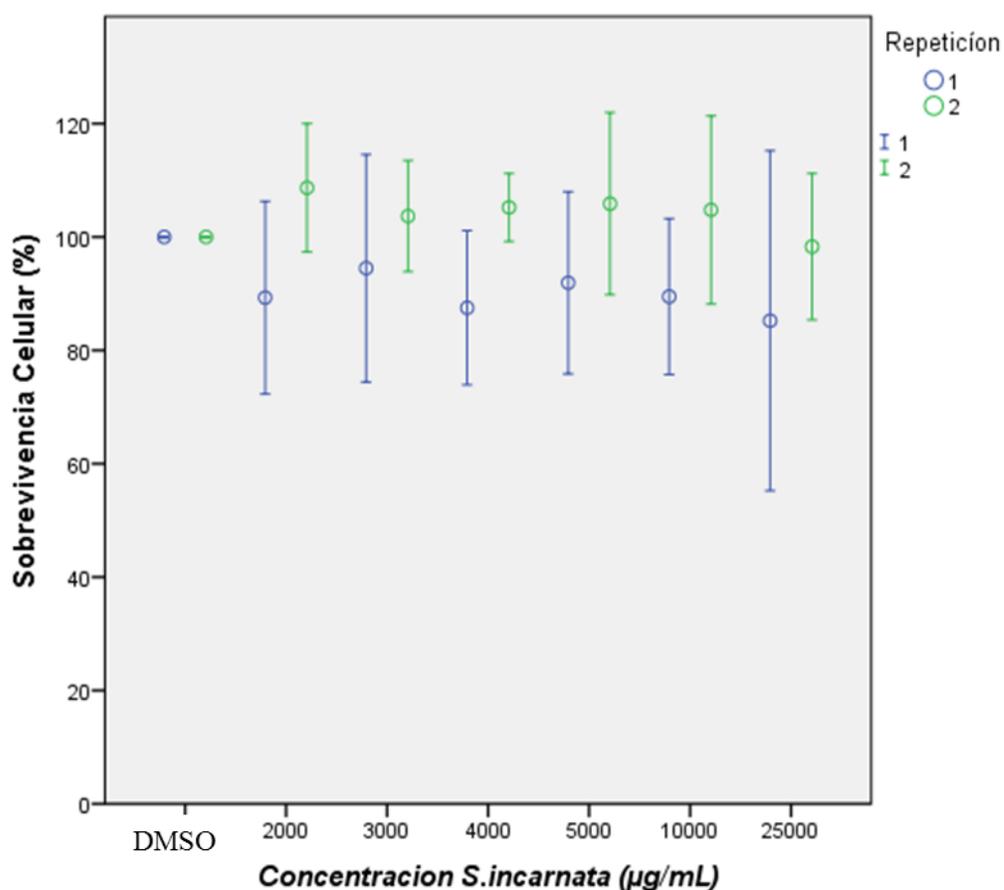


Figura 16. Porcentaje de sobrevivencia celular de linfocitos humanos tratados con las siete concentraciones del extracto de *S.incarnata* y el control negativo. Valores expresados como Promedio \pm desviación estándar, de dos experimentos independientes por triplicado.

Para determinar si los extractos vegetales tienen un efecto citotóxico relacionado con el tiempo de exposición, se realizó un análisis estadístico comparando la sobrevivencia de los linfocitos a las 24 y 48 horas de tratamiento y se encontró que las diferencias entre dichos valores si fueron estadísticamente significativos. En la figura 17 se representan los valores de sobrevivencia promedio de los linfocitos sometidos a las diferentes concentraciones de *S. incarnata* durante 24 y 48 horas de tratamiento.

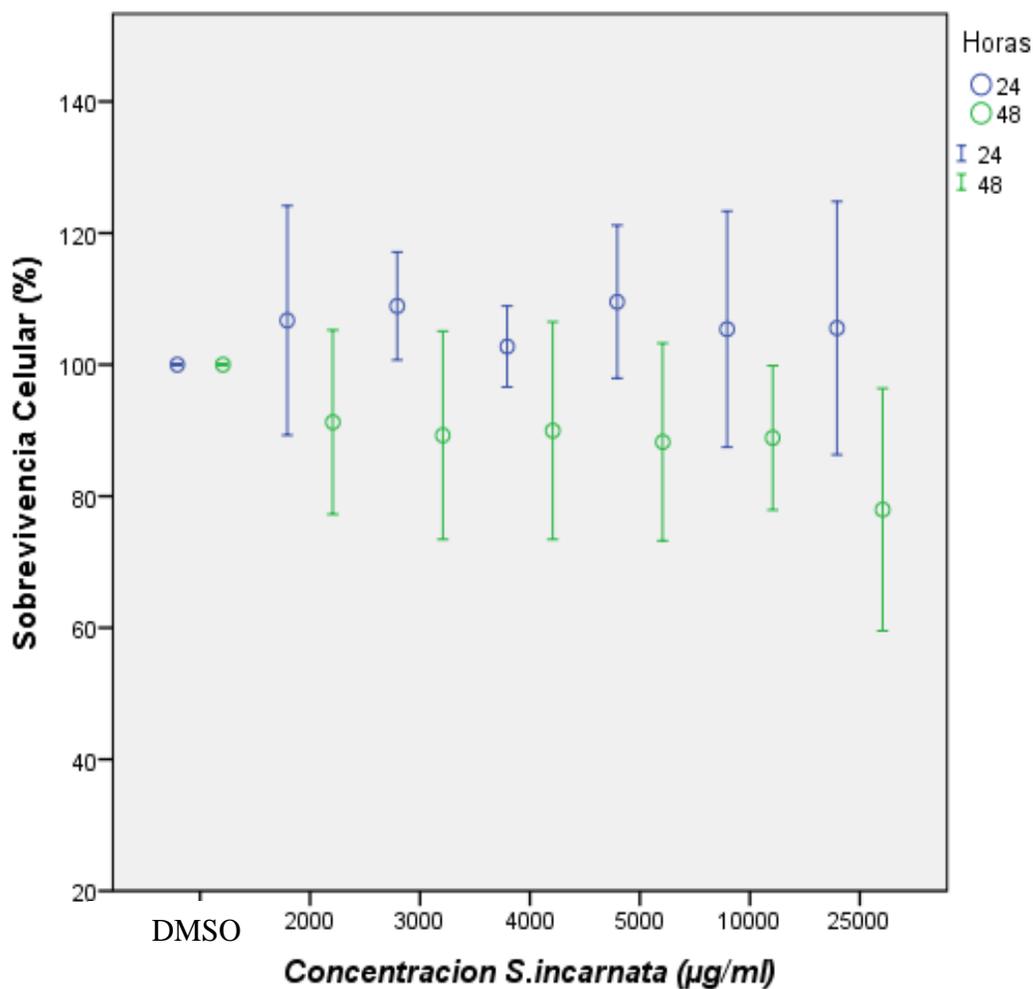


Figura 17. Porcentaje de sobrevivencia celular de linfocitos humanos tratados con las siete concentraciones del extracto de *S. incarnata* y el control negativo durante

24 y 48 horas. Valores expresados como Promedio \pm desviación estándar, de dos experimentos independientes por triplicado.

El valor calculado promedio de sobrevivencia a las 24 horas fue de $(105,55 \pm 12,67)$ y a las 48 horas $(89,36 \pm 14,41)$. El valor individual más alto se encontró a las 24 horas, presentando un porcentaje de sobrevivencia de $(109,55 \pm 11,61)$ a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ML}$ y el valor mínimo fue $(77,95 \pm 18,43)$ a una concentración de 25,000 $\mu\text{g}/\text{ML}$. Como se observa en la figura 18 en un tiempo de exposición de 48 horas se presentó reducción de viabilidad.

En cuanto al efecto del extracto de *J. pectoralis* sobre la viabilidad de los linfocitos, el análisis estadístico arrojó diferencias significativas entre los valores de sobrevivencia de las células respecto al control negativo (DMSO) en dos repeticiones independientes, como se observa en la figura 18.

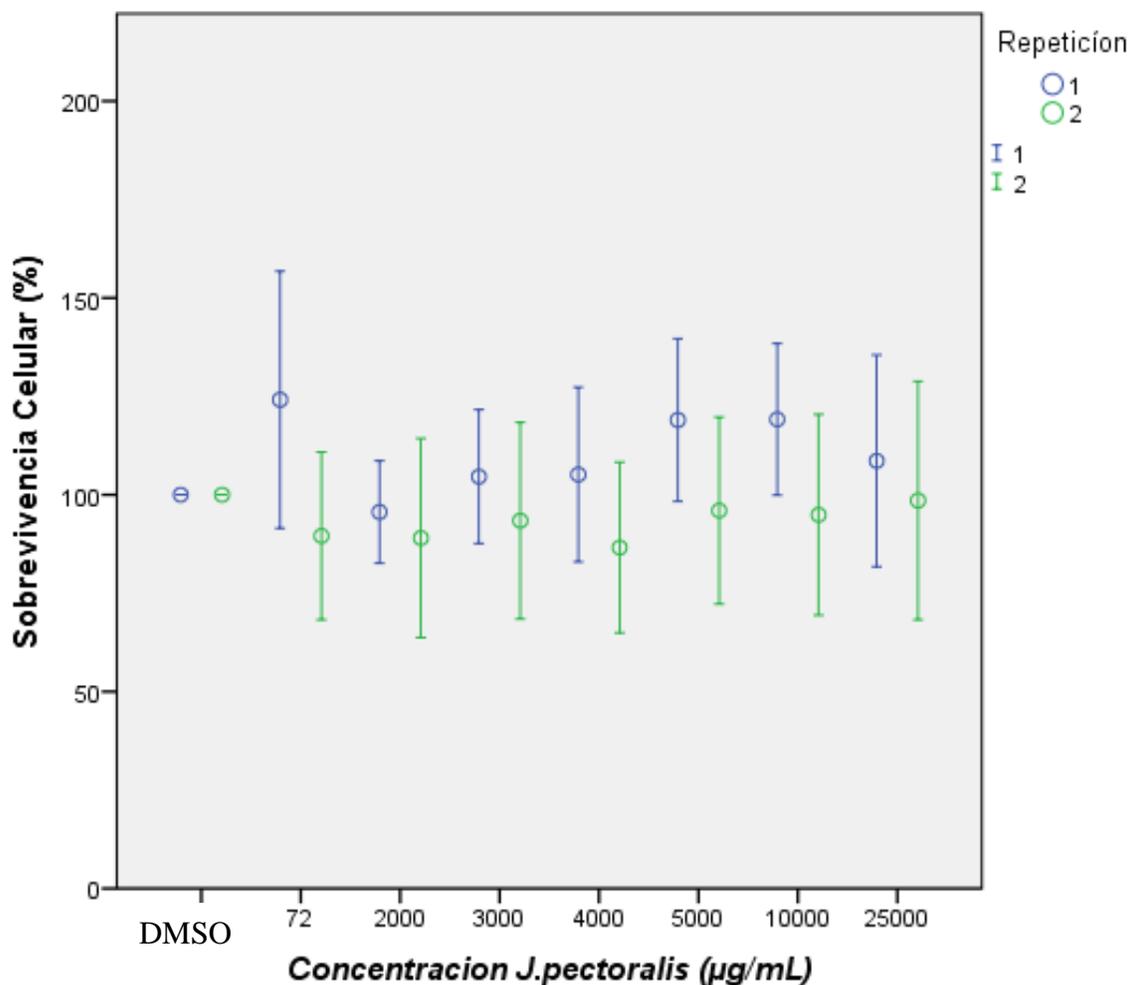


Figura 18. Porcentaje de sobrevivencia celular de linfocitos humanos tratados con las ocho concentraciones del extracto de *J. pectoralis* y el control negativo. Valores expresados como Promedio \pm desviación estándar, de dos experimentos independientes por triplicado.

El valor calculado promedio de sobrevivencia en la primera repetición fue de $(109,53 \pm 21,65)$ y en la segunda repetición $(93,50 \pm 21,89)$. El valor individual más alto se encontró en la primera repetición, presentando un porcentaje de sobrevivencia de $(123,13 \pm 32,66)$ a una concentración de $7,2 \mu\text{g}/\text{ML}$ y el valor mínimo $(86,59 \pm 21,66)$.

El tiempo de exposición de los linfocitos frente al extracto de *J. pectoralis* no ocasionó diferencias estadísticamente significativas entre los valores de sobrevivencia de las células respecto al control negativo (DMSO), figura 19.

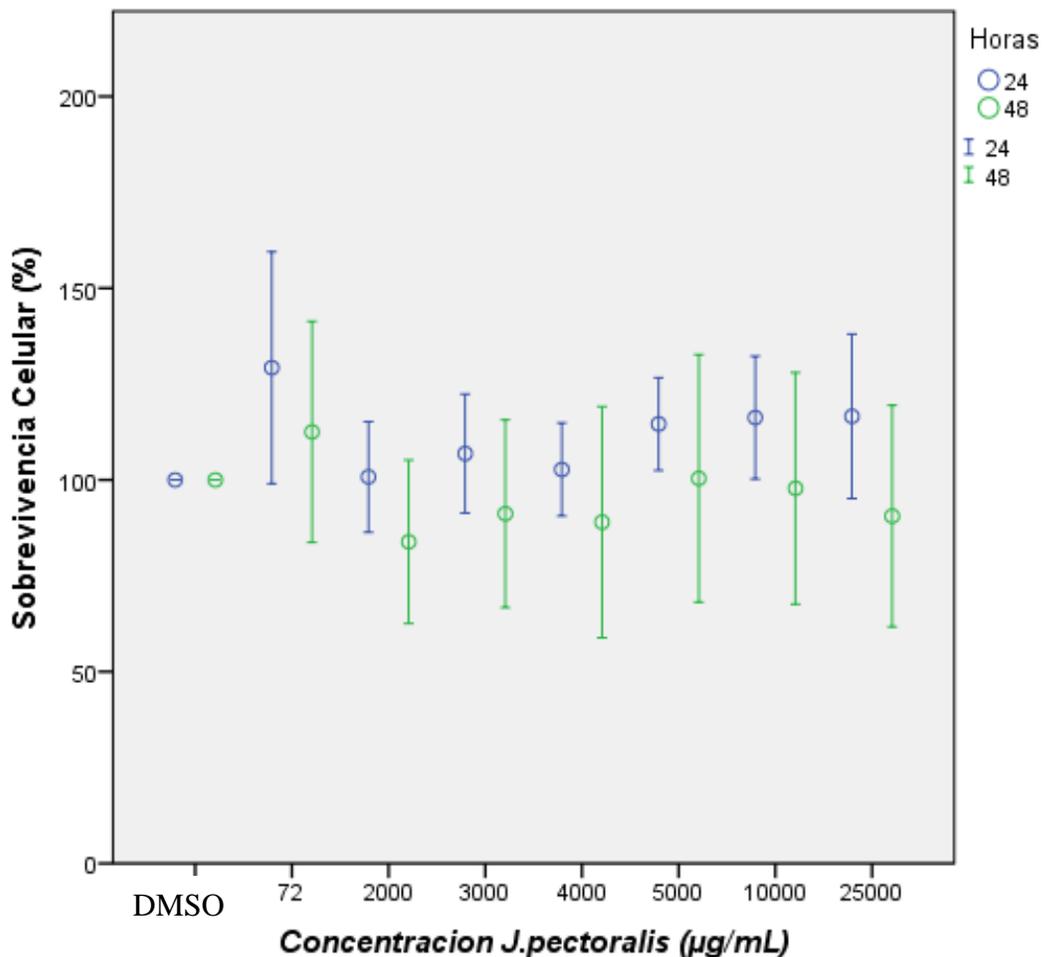


Figura 19. Porcentaje de sobrevivencia celular de linfocitos humanos tratados con las ocho concentraciones del extracto de *J. pectoralis* y el control negativo durante 24 y 48 horas. Valores expresados como Promedio \pm desviación estándar, de dos experimentos independientes por triplicado.

El valor calculado promedio de sobrevivencia a las 24 horas fue de $(109,65 \pm 16,74)$ y en la segunda repetición $(95,66 \pm 25,79)$. El valor individual más alto se encontró en la primera repetición, presentando un porcentaje de sobrevivencia de

(117,64 ± 25,28) a una concentración de 7,2 µg/ML y el valor mínimo (88,99 ± 30,12) a una concentración de 4 µg/ML.

En general, los linfocitos expuestos a las diferentes concentraciones de los extractos de *S.incarnata* y *J. pectoralis*, no ocasionaron un efecto citotóxico, encontrándose que no habían diferencias estadísticamente significativas entre dichos valores. Sin embargo cuando se compara la sobrevivencia celular entre cada repetición con dichos extractos el análisis estadístico arrojó diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte, el análisis estadístico no detectó un efecto citotóxico para el extracto de *J. pectoralis*, durante 24 y 48 horas, pero sí se encontró un efecto citotóxico para el extracto de *S.incarnata* a diferentes concentraciones a las 48 horas de exposición. Por lo tanto este resultado es una alerta de un posible efecto que depende del tiempo de exposición, el cual debe ser verificado a través de la realización de más experimentos para aumentar el número de repeticiones.

Este mismo resultado se observa en la figura 20 que representa la curva de dosis-efecto y que relaciona las concentraciones evaluadas del extracto *S. incarnata* con los porcentajes de sobrevivencia.

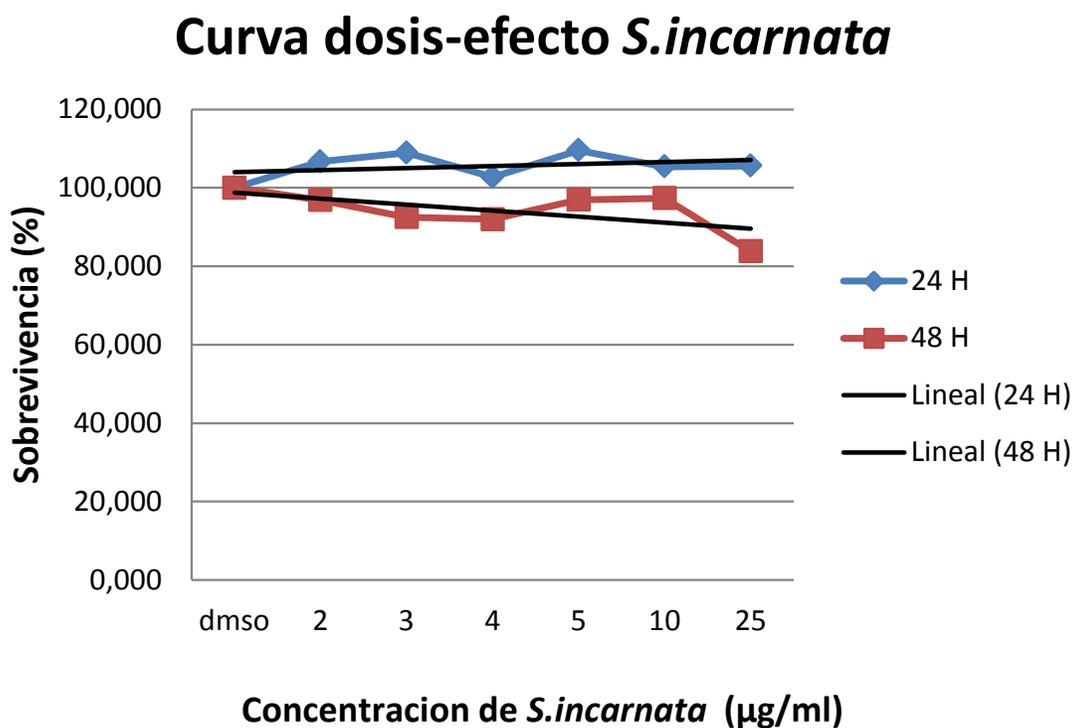


Figura 20: Porcentaje de sobrevivencia de linfocitos humanos tratados con siete dosis diferentes de *S. incarnata*, durante 24 y 48 horas. Cada punto es el valor promedio obtenido en dos experimentos independientes por triplicado.

En la figura 21 se observa el efecto del extracto de *J. pectoralis* sobre los linfocitos humanos a diferentes concentraciones evaluadas. El porcentaje de sobrevivencia celular presenta una tendencia similar a las 24 y 48 horas de exposición.

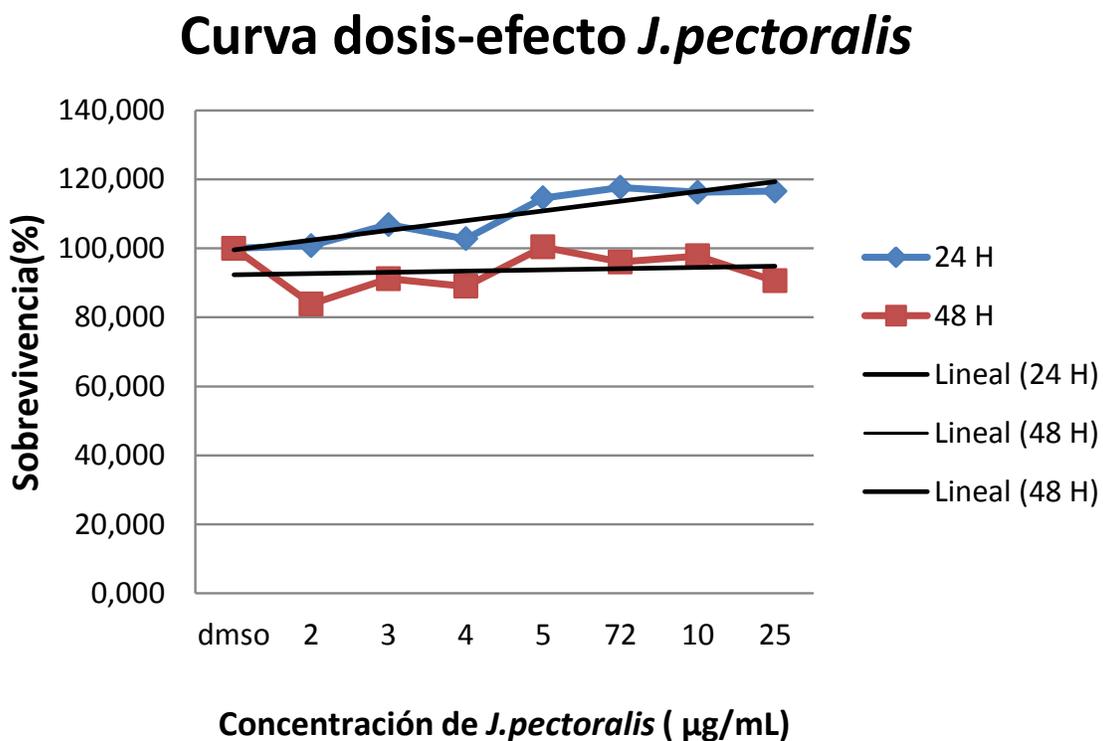


Figura 21: Porcentaje de sobrevivencia de linfocitos humanos tratados con siete dosis diferentes de *J. pectoralis*, durante 24 y 48 horas. Cada punto es el valor promedio obtenido en dos experimentos independientes por triplicado.

8. DISCUSIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la medicina tradicional constituye una nueva categoría terapéutica que revolucionó el esquema de tratamiento medicinal de fines del siglo XX y marca un aporte ascendente en el siglo XXI. La existencia de plantas con un elevado potencial terapéutico constituye una alternativa farmacológica de marcado interés en el tratamiento de muchas enfermedades, de ahí la importancia de realizar estudios preclínicos con el propósito de detectar posibles efectos tóxicos post administración. Dentro de la batería de ensayos de primera barrera se encuentran los estudios de citotoxicidad imprescindibles en la estimación del potencial tóxico de una sustancia de origen natural o sintético. Por lo general se trata de pruebas simples y rápidas por medio de las cuales se obtienen resultados cuali-cuantitativo. Por esa razón, la implementación del método de Alamar blue es crucial para valorar detalladamente la proliferación celular y la citotoxicidad, debido a que ha resultado ser mucho más fácil y seguro con respecto a ensayos de viabilidad tales como MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) y sulforodamina B (SRB) debido a que es un método no destructivo que permite al investigador retirar o adicionar tratamientos sobre la misma población celular evaluada, para futuros análisis, como ensayos post tratamiento, sin necesidad de perder células (O'Brien *et al.*, 2000; Pagé *et al.*, 1993).

En este estudio, las diferentes concentraciones evaluadas de los extractos vegetales de *S. incarnata* y *J. pectoralis*, no ocasionaron un efecto citotóxico, sin embargo, se obtuvieron algunos datos de la sobrevivencia de las células alejados del control, lo cual posiblemente se debe a variables que no se pueden controlar, y que pueden alterar los resultados, como mantener una cantidad fija de células en cultivo y células provenientes de un solo donante. Se ha reportado que la interacción bioquímica generada por los extractos vegetales en los linfocitos humanos de cada individuo, depende de diversos factores como la carga genética, más específicamente polimorfismos que confieren al ser humano la capacidad para metabolizar las sustancias que ingresan al organismo (moléculas exógenas)

confiriéndoles características tóxicas o bien neutralizándolas y volviéndolas inofensivas. Además se ha evidenciado que a nivel molecular las isoenzimas citocromo-P 450 (CPY) encargadas de llevar a cabo procesos de metabolización de un gran número de drogas y químicos estructuralmente diversos (Rodríguez *et al*; 2008), tienen variaciones genéticas que pueden alterar el funcionamiento o procesamiento adecuado de los compuestos que ingresan al organismo. De aquí la importancia de, no solo profundizar en los estudios dirigidos al tratamiento de enfermedades con extractos de plantas para determinar sus efectos curativos o sus efectos nocivos, si no determinar la predisposición genética de cada individuo influye directamente en la reacción final después de metabolizada la sustancia dentro del organismo.

Por otro lado, el extracto de *S. incarnata* causó un efecto citotóxico leve en los linfocitos humanos después de las 24 horas de exposición a concentraciones de 2000, 3000, 4000, 5000, 10,000, 25,000 µg/ML, mientras que a las 24 horas se obtuvieron algunos porcentajes de sobrevivencia con valores de 102,59% a 112,10 % en concentraciones de 4000 µg/ML y 3000µg/ML respectivamente. Esto puede relacionarse con el denominado fenómeno de hormesis (Kinoshita *et al*; 2006), descrito como un patrón de dosis-respuesta a algunos productos químicos tóxicos observado en distintos tipos celulares, caracterizado por una estimulación de la proliferación a dosis bajas, su mecanismo molecular aún no está claro y aún no se ha establecido si es un fenómeno universal que afecta a todos los tipos de células, este efecto ha sido relacionado con proliferación celular y por lo tanto está implicado en la carcinogénesis (Matés *et al*; 2008). De esta manera, estos resultados resaltan la importancia de realizar más ensayos experimentales para aumentar el número de repeticiones.

A pesar de esto, el análisis total de los datos no evidenció un efecto citotóxico ocasionado por los extractos de *S. incarnata* y *J. pectoralis*. Este hecho es posible, debido a que en el estudio fitoquímico realizado por el grupo de Química de Productos Naturales – QPN, de la universidad del Cauca, se identificaron

compuestos químicos los cuales estarían implicados en la ausencia de citotoxicidad.

El extracto etanólico de *S. incarnata*, reporto grupos de compuestos químicos como: flavonas hidroxiladas, terpenos, terpenoides y flavonoides de tipo flavonas, flavonoles, flavanonas. Los resultados obtenidos apoyan el uso tradicional que se le ha dado a la planta *S. incarnata*, ya que la presencia de flavonoides, justificaría el uso como antidepresivo y antiestrés, además antiespasmódico característico de los terpenos presentes.

Adicionalmente el análisis fitoquímico del extracto etanólico de *J. pectoralis*, ha reportado la presencia de grupos de compuestos químicos como: taninos, fenoles, cumarinas, flavonas hidroxiladas, saponinas, terpenoides, fenoles totales y flavonoides. El uso etnobotánico como ansiolítico se podría explicar tanto por los flavonoides presentes como por las saponinas que a su vez corroboran el uso como antiinflamatorio. Además de la presencia de lignanos mencionados anteriormente, está asociada con la actividad antidepresiva y antiarrítmica (Joseph *et al.*, 1988). Así como el contenido de flavonoides relacionados con la actividad antioxidante para controlar dolores e inflamaciones (Pérez *et al.*, 2001b). Por lo tanto, esta investigación y sus resultados resaltan la importancia de continuar con este tipo de estudios, debido a que el presente trabajo es el primer reporte de dicha actividad.

A pesar de esto, existen estudios similares que dan cuenta acerca de esta actividad, como los estudios realizados con los extractos etanólicos de las especies *Tibouchina longifolia*, *Mangifera indica*. A través del índice mitótico se determinó que dichos extractos no causaron actividad citotóxica en concentraciones de 1.24µg/mL 12.4µg/mL 124µg/mL en linfocitos humanos, esto se debe a que existen grupos de compuestos polifenólicos presentes en dichas plantas los cuales poseen una actividad antioxidante y citoprotectora (Montoya *et al.*; 2003).

La actividad citotóxica también ha sido estudiada en tres especies medicinales del género *Kalanchoe*, denominadas: *K. pinnata*, *K. daigremontiana* y *K. flammea*, probadas en cultivos *in vitro*, utilizando la técnica de MTT. Los resultados indican que ninguno de los extractos es citotóxico en concentraciones 1.562 a 200 µg/ml para dichas células. La gran cantidad de metabolitos presentes como los triterpenos y los flavonoides en las especies de *K. pinnata*, *K. daigremontiana* y *K. flammea*, son los responsables de la ausencia de citotoxicidad (Herrera *et al*; 2010).

Por otro lado, se ha evaluado el efecto citotóxico del extracto metánolico de la corteza de *Psidium guajava*, utilizando la exclusión de azul de tripano en células mononucleares de sangre periférica. El extracto metánolico de *Psidium guajava*, no fue citotóxico en concentraciones de 200, 100, 50 y 20µg/mL, presentando un porcentaje de sobrevivencia entre el 85% y 95%. Si bien se ha determinado que compuestos presentes en el extracto de *Psidium guajava* como polifenoles, antocianinas y carotenoides tienen actividad antioxidante (Durán *et al* 2013). La propiedad antioxidante, se relaciona con la protección de membranas celulares, ya que inhibirían la interacción de los componentes estructurales tipo fosfolípidos inhibiendo su oxidación y protegiendo la misma de daños causados por compuestos oxidantes (García *et al.* 2001).

En el área de la salud mental, uno de los trastornos psiquiátricos con mayor prevalencia a nivel mundial, es la ansiedad, que afecta del 5 al 10% de la población general y tiende a incrementarse debido a los factores estresantes ambientales y a los problemas socioeconómicos actuales. Este trastorno, de manera natural, es una emoción que permite al individuo prepararse para responder a cambios del medio ambiente; no obstante, cuando sobrepasa el umbral emocional se vuelve patológico e interfiere de manera negativa con las actividades cotidianas de quienes la padecen (Bouton *et al.*, 2001). Los trastornos de ansiedad se caracterizan por generar cambios motores, irritabilidad, actitudes agresivas o de desaprobación, sensación de vulnerabilidad, vigilancia exacerbada y reacciones emocionales exageradas ante una situación de peligro; todos estos

síntomas son persistentes a través del tiempo e independientes de los estímulos externos que los provocan (Kaplan *et al.*, 2002).

Desde un punto de vista neuroquímico, se han implicado tres sistemas de neurotransmisión con la ansiedad: noradrenalina, GABA, y serotonina. Es por ello que los fármacos habitualmente empleados en el tratamiento de la ansiedad están relacionados con estos sistemas (Jonas *et al.*, 1993; McCann, 1995; Petty *et al.*, 1993).

En la actualidad se han realizado estudios, en busca de principios activos de plantas con propiedades ansiolíticas con menor posibilidad de ocasionar efectos secundarios. Especialmente compuestos como los flavonoides, pigmentos vegetales no nitrogenados de bajo peso molecular (Barberán *et al.*, 1990). Los cuales interactúan de manera directa o indirecta con los sistemas esenciales de neurotransmisión cerebral, además modulan la actividad de diversas enzimas en las cascadas de señalización de procesos tan importantes como el de la memoria y el aprendizaje, promoviendo un mejor funcionamiento neuronal (Huang *et al.*, 2001).

Paladini y colaboradores (1983) realizaron estudios de unión a receptores a benzodiazepinas (BDZ) con la esperanza de encontrar principios activos de origen vegetal con estructuras similares a las (BDZ). Como resultado de este estudio aislaron y demostraron por primera vez que la flavona crisina y la apigenina aisladas de la pasiflora *Passiflora coerulea*, de la manzanilla *Matricaria rucutita* y el núcleo flavona en sí mismo, poseen propiedades ansiolíticas en modelos de conducta en ratones. En modelos *in vitro* estos metabolitos secundarios mostraron alta y mediana afinidad por el sitio de unión a (BDZ). Estas flavonas presentaron además escasa actividad sedante y miorelajante, lo cual representó la primera ventaja de estos metabolitos sobre las (BDZ) y mostró su potencial como fármacos para uso humano. Siguiendo la investigación de estos importantes hallazgos, Paladini y colaboradores (1983) hicieron modificaciones químicas de las flavonas ansiolíticas naturales y obtuvieron derivados con mejores propiedades, de los cuales la 6,3'-dinitroflavona mostró una afinidad por los receptores cerebrales

específicos, comparable a la de las (BDZ), pero con una actividad 10 veces superior. También realizaron un estudio análogo al descrito, con las valerianas, plantas de uso milenario en la medicina tradicional por sus propiedades tranquilizantes e inductoras del sueño. Esta investigación permitió descubrir en sus extractos la presencia del flavonoide 6-metilapigenina, que resultó ser un ligando para el receptor GABAA con propiedades ansiolíticas pero no sedantes ni hipnóticas, y de los rutinósidos de flavanona hesperidina y linarina, que no tuvieron afinidad por el receptor GABAA ni presentaron efectos ansiolíticos. En cambio, ambos rutinósidos hesperidina y linarina resultaron potentes sedantes e hipnóticos (Marder *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2009; Wolfman *et al.*, 1996).

Adicionalmente los efectos ansiolíticos también han sido estudiados en *J. pectoralis*, conocida popularmente como “amansatoros” permitiendo corroborar la información etnobotánica y esclarecer las vías por las cuales la planta ejerce su actividad sobre el sistema nervioso central. Estos estudios farmacológicos fueron confirmados a través de la prueba laberinto en cruz elevado campo abierto y la prueba de tiempo de sueño pentobarbital. El extracto se administró por vía intragástrica a ratones macho en dosis únicas de 50, 100 y 200 mg / kg. Los resultados mostraron que el extracto de *J. pectoralis* modificó significativamente todos los parámetros observados en la prueba de laberinto en cruz elevado, sin alterar la actividad motora general en el campo abierto y pruebas de tiempo de sueño pentobarbital. De manera interesante ensayos *in vitro*, han demostrado que el extracto de *J. pectoralis* ejerce su acción a través de la activación de los sistemas GABAérgico y opioide. Los resultados mostraron que *J. pectoralis* presentó un efecto de tipo ansiolítico, desmintiendo efectos sedantes (Venâncio *et al.*; 2010). Respecto a la especie *S. Incarnata* no se han reportado estudios afines. Sin embargo el uso de “alegría” *S. Incarnata*, está implicada en el tratamiento de trastornos depresivos (Gonzales, 2005), caracterizados por la presencia de tristeza, pérdida de interés o placer, sentimientos de culpa o falta de autoestima, trastornos del sueño o del apetito, sensación de cansancio y falta de concentración. Este trastorno está asociado con cambios en la neurotransmisión del sistema nervioso central y cambios estructurales en el cerebro, producidos

por niveles anormales de la serotonina, norepinefrina y dopamina neurotransmisores aminérgicos que actúan en las neuronas del sistema nervioso central, implicados en la fisiopatología de la depresión (Baldwin and Birtwistle, 2002). La actividad antidepressiva de *S. Incarnata*, estaría asociada a grupos de compuestos químicos como flavonoides de tipo flavona y saponinas que corroborarían el uso como ansiolítico, mejorando el humor y la irritabilidad (Ordoñez and Pineda, 2013).

En este sentido, la medicina tradicional representa una opción importante de respuesta ante las necesidades crecientes de atención a la salud mental, provocadas por el creciente y constante estrés de las sociedades modernas y de los efectos colaterales que se han venido presentando con las benzodiazepinas como tolerancia, dependencia y síndrome de abstinencia. Es por esto que se ha incrementado la búsqueda y desarrollo de fármacos con propiedades ansiolíticas con menor potencial para inducir reacciones adversas.

En nuestro estudio las plantas *S. incarnata* y *J. pectoralis*, no evidenciaron citotoxicidad, esta información proporciona resultados útiles en cuanto a la seguridad, como parte de los requisitos para cumplir con las necesidades del consumidor, como lo ha estipulado el INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos) a través del decreto 677 de 1995. Recordando que, esta normatividad señala que, aunque el largo uso tradicional de las plantas posee una garantía de inocuidad, no puede deducirse que estén exentas de efectos secundarios contraindicaciones o interacciones que puedan atentar la salud de las personas. Por lo tanto el uso de plantas medicinales requiere de estudios científicos válidos con la finalidad de demostrar el escaso o nulo potencial tóxico de las mismas. Los datos de seguridad deben ser conocidos y tenidos en cuenta para garantizar un uso racional y seguro. De esta manera, los resultados obtenidos representan el inicio de una gran batería de pruebas a nivel preclínico para garantizar o recomendar según la farmacopea tradicional. En este sentido, la importancia de garantizar productos fitoterapéuticos promueve iniciativas que fortalezcan el conocimiento de grupos indígenas; además se ofrecerá una mayor

disponibilidad y estabilidad en la oferta de estos recursos naturales para la salud de la población.

9. CONCLUSIONES

- Los extractos de *S. incarnata* y *J. pectoralis* no presentaron actividad citotóxica sobre los linfocitos humanos cultivados *in vitro*.
- La sobrevivencia de los linfocitos no resultó afectada por el extracto *J. pectoralis* a concentraciones de 25.000, 10.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2,000 y 7.200, 5.000, 4.000, 3.000, 2,000 µg/MI, ni por el tiempo de exposición, 24 y 48 h.
- La sobrevivencia de los linfocitos no resultó afectada por el extracto de *S. incarnata* a concentraciones de 25.000, 10.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2,000 y 7.200, 5.000, 4.000, 3.000, 2,000 µg/MI, pero si se obtuvo un efecto debido al tiempo de exposición, ya que a las 48 h se observó una disminución en el porcentaje de sobrevivencia celular
- Los resultados obtenidos representan una primera información en cuento a la seguridad de los extractos de *S. incarnata* y *J. pectoralis*, con la finalidad de continuar con estudios de citotoxicidad y genotoxicidad que confirme que la dosis utilizada tradicionalmente para el tratamiento de trastornos nerviosos, no constituya un peligro para el consumo humano.
- Los resultados arrojados por el presente estudio proporcionan información básica sobre la toxicidad de *S. incarnata* y *J. pectoralis* como parte del proceso de evaluación y regulación del consumo de estas plantas medicinales para los consumidores.

- El método de reducción de la resazurina como indicador de supervivencia celular permitió valorar de manera confiable y rápida la citotoxicidad de los extractos de *S. incarnata* y *J. pectoralis* sobre linfocitos humanos.

10. SUGERENCIAS

- Reproducir los ensayos realizados para obtener un mayor número de datos sobre la actividad citotóxica de las plantas *S. incarnata* y *J. pectoralis*, con la finalidad de tener mayor confiabilidad sobre los resultados obtenidos y principalmente, sobre el posible efecto mitogénico observado, debido a que este estudio es el primer reporte acerca de dicha actividad.
- Analizar de forma individual los compuestos activos de las plantas *S. incarnata* y *J. pectoralis*, con el propósito de identificar compuestos de interés farmacológico.
- Sería de gran importancia, realizar ensayos en los que se evalué la actividad antioxidante, anticonvulsivo, hepatoprotectora, anticancerígena empleando líneas celulares derivadas de tumores, fibroblastos, hepatocitos, células neuronales, con el fin de corroborar otras de las propiedades farmacológicas de los extractos *S. incarnata* y *J. pectoralis*.
- Se recomienda evaluar los extractos transformados de *J. pectoralis* y *S. incarnata* para la comercialización, debido a que en este estudio solo se incluyen dichos extractos en su forma pura.
- Efectuar ensayos a nivel clínico debido a que los estudios preclínicos no son suficientes para determinar si un fármaco determinado tendrá las características deseadas de eficacia y seguridad en las personas, dado que depende de reacciones que no pueden ser adecuadamente determinadas en cultivos *in vitro* o animales como cefalea, depresión, ansiedad. Por esta razón, antes de su posible aprobación, un fármaco debe ser probado en seres humanos.

- Determinar en posteriores estudios si los extractos de *S. incarnata* y *J. pectoralis* provocan proliferación celular, probablemente como respuesta frente a algunos compuestos químicos presentes en las plantas, como flavonas hidroxiladas, terpenos, terpenoides, cumarinas, saponinas, fenoles totales, taninos y flavonoides.

11. BIBLIOGRAFIA

Amborabé BE, Fleurat-Lessard P, Chollet JF, Roblin G (2002). Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: structure-activity relationship. *Plant Physiol Biochem* 40: 1051-1060.

Arteche, Alejandro. Medicina naturista y fitoterapia (1994). *Natura Medicadrix*. 37-38, invierno -95:5-9

Awad R, Arnason JT, Trudeau V, Bergeron C, Budzinski JW, Foster BC, Merali Z (2003). Phytochemical and biological analysis of skullcap (*Scutellaria lateriflora* L.): a medicinal plant with anxiolytic properties. *Phytomedicine*. 10(8):640-9

Alarcon, P. (2005). Efecto de la administración del extracto de *justicia pectoralis* sobre la conducta de ratas, en la prueba de laberinto en cruz elevado asimétrico y tiempo de sueño inducido por pentobarbital sódico (Tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Chile.

Albert, B; Johnson, A, *et al.* (2002). "Molecular Biology of the Cell", Editorial Garland, 4ta. Edición.

Al-Juaid, S.S. and Abdel-Mojib, M.A. (2004). A novel podophyllotoxin lignan from *Justicia heterocarpa*. *Chem Pharmaceut Bull* 52: 507-509.

Ananthi, R; Chandra, N, *et al.* (2010). Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* extract in cultured lymphocytes. *Journal of Ethnopharmacology*. 127: 558-560.

Andrade, A. (2003). Esquema de Ordenamiento Territorial Municipio de Inzá – Cauca.

Angonese, M.T; Moreira D.L, *et al.* (1992). Perfil Químico da familia acanthaceae .*Bol Mus Biol. Mello Leitão* 1: 3-6.

Awad, R; Arnason, J.T, *et al.* (2003). Phytochemical and biological analysis of skullcap (*Scutellaria lateriflora* L.): a medicinal plant with anxiolytic properties. *Phytomedicine*.10(8):649.

Ballard C.G, O'Brien J.T, Reichelt K, Perry E.K. (2002). Aromatherapy as a safe and effective treatment for the management of agitation in severe dementia: the results of a double-blind, placebo-controlled trial with Melissa. *J Clin Psychiatry*; 63: 553-558. 46.

Barbosa, H.J. and Arias, D.(1995). Aplicación de una metodología *in vitro* para evaluar la toxicidad de extractos vegetales.

Beltrán R (1995). Administración de medicamentos. Alicante: Colegio Oficial de Farmacéuticos de Alicante; España. *Journal of Ethnopharmacology*. 13: 53-56.

Bernal, H. Y; Garc, H, *et al.* (2011) a. Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia. Estrategia nacional para la conservación de plantas. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial e Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C., Colombia. Ediprint. 232 páginas.

Bernal, S; Aller, A.I, *et al.* (2011) b. Comparison of the Sensititre Yeast One colorimetric microdilution method for antifungal susceptibility testing against *Candida* spp. *Chemotherapy*; 48: 21-25.

Bermúdez *et al.* (2006).Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo REDVET. *Revista electrónica de Veterinaria* 1695-7504 Vol. 8: 3.

Bolye, S.P; Doolan, P.J, *et al.* (2011). Evaluation of quality control strategies in *Scutellaria* herbal medicines. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 54(5): 951-957.

Bouton ME, Mineka S, Barlow DH. A modern's learning theory on the etiology of panic disorder *Psychological Review* 2001; 108(1): 4-32.

Celikler, S; Vatan, O, *et al.* (2009). Evaluation of antioxidative, genotoxic potency of *Codium tomentosum* Stackhouse ethanolic extract in human lymphocytes *in vitro*. 47: 796-801.

Chariandy, C.M; Seaforth, C.E, *et al.* (1999). Detección de plantas medicinales de Trinidad y Tobago para propiedades antimicrobianas e insecticidas *J Ethnopharmacol* 64: 265-270.

Chen C.C, Hsin W.W, Ko F.N, Huang YL, Ou JC, Teng CM (1996). Antiplatelet arylnaphthalide lignans from *Justicia procumbens*. *J Nat Prod* 59: 1149-1150.

Cole, I. B; Saxena, P. K, *et al.* (2007). Medicinal biotechnology in the genus *Scutellaria*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant*, 43: 318–327.

Comisión Asesora en Plantas Medicinales. (2007). La Habana: Base de Datos FITOTOX.

Corrêa,G.M. y Alcântara, A.F. (2012). Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia* - a review, *Farmacognosia*. 22: 220–238.

CYTED. (1995). Manual de Técnicas de Investigación. Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para la investigación.

Davis M. (1992). A neural systems approach to the study of the amygdala, fear and anxiety. En: Elliott JM, Heal DV, Marsden CA, ed. *Experimental approaches to anxiety and depression*. New York: John Wiley & Sons Ltd.

Day SH, Lin Y.C, Tsai M.L, Tsao L.T, Ko H.H, Chung M.I, Lee J.C, Wang J.P, Won S.J, Lin C.N (2002). Potent cytotoxic lignans from *Justicia procumbens* and their effects on nitric oxide and tumor necrosis factor-production in mouse macrophages. *J Nat Prod* 65: 379-381.

Decreto N°677. (1995). Por el cual se reglamenta parcialmente el Régimen de Registros y Licencias, el Control de Calidad, así como el Régimen de Vigilancia Sanitaria de Medicamentos, Cosméticos, Preparaciones Farmacéuticas a base de Recursos Naturales, Productos de Aseo, Higiene y Limpieza y otros productos de uso doméstico y se dictan otras disposiciones sobre la materia. INVIMA, Colombia. Ministerio de la Protección Social.

Deepak M, Dipankar G, Prashanth D, Asha MK, Amit A, Venkataraman BV (2002). Tribulosin and β -sitosterol- D-glucoside, the anthelmintic principles of *Tribulus terrestris*. *Phytomedicine* 9: 753-756.

Del Valle, L., Macías A, C, *et al.* (2002). Efecto *in vitro* de la hemina sobre la proliferación de los linfocitos humanos. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 18(2):20-22.

De Sousa A.C, Alviano D.S, Blank A.F, Alves P.B, Alviano C.S, Gattas C.R. (2004)a. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J Pharm Pharmacol*; 56: 677-681.

De Sousa A. (2013)b. Herbal medicines and anxiety disorders: an overview. *Journal of Medicinal Plants Studies* 1(6): 18-23.

Dhawan K, Kumar S, Sharma A (2001). Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnate*. *Fitoterapia*; 72(5): 922-926.

Domínguez X.A, Achenbach H, González C.C, Ferré-D'Amore AR (1990). Estudio químico del muile (*Justicia spicigera*). *Rev Latinoamer Quím* 21: 142-143.

Duke, J.A. (1990). CRC handbook of medicinal herbs. *International Clinical Psychopharmacology* 5: 74-96.

Dueñas L. (2010). *Intoxicaciones Agudas en Medicina de Urgencia y Cuidados Críticos*. 2ª ed. Valladolid, España: Masson S.A; p. 3-126, 344-350, 368-379.

Durán, M.; Montero, P.; Marrugo, Y. (2013). Extractos metanólicos de corteza de guayaba (*Psidium guajava* L.) y mango (*Mangifera indica* L.): efecto citotóxico, antihemolítico y en la morfología de membrana de eritrocitos. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 16(2): 327-334.

Eaton W.W. (1995). Progress in the Epidemiology of anxiety disorders. *Epidemiol Rev*; 17:32-38.

Elloyd (2002). Manual del reactivo AlamarBlue. disponible en internet: techsupport@invitrogen.com (Consulta 12 de febrero de 2015).

Ezer, N; Akcos, Y, *et al.* (1998). Neo-clerodaneterpenoids from *Scutellaria orientalis* subsp. *Sintenisii*. *Phytochemistry* 49: 1825-1827.

Fei Y, *et al.* (2002). Anticancer Activity of *Scutellaria baicalensis* and Its Potential Mechanism. *Journal of Alternative & Complementary Medicine*. 8 (5):567-573.

Fields, R.D. y Lancaster, M.V. (1993). Dual attribute continuous monitoring of cell proliferation cytotoxicity. *American Biotechnology Laboratory*: 11 (4): 48-50.

Freshney, R.I. (2011). *Culture of Animal Cells: A Manual of basic technique and specialized applications* (6th Ed.). John Wiley and Sons Ltd.

Fuentes, V; y Granada, M. (1982). Estudio sobre la medicina tradicional en Cuba. I. *Rev Plant Med*; 2:25-46.

Fukamiya N, Lee K (1986). Antitumor agents, 81. Justicidin-A and diphyllin, two cytotoxic principles from *Justicia procumbens*. *J Nat Prod* 49: 348-350

Gao, Z; Huang, K, *et al.* (1999). Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from of radix *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General subjects* 1472-643-650.

García Bacallao, L.; *et al.* (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. *Rev. Cub. Invest. Biomédicas*. 20(3):231-235.

Ghosal S, Banerjee S, Frahm AW (1979). Prostalidins A, B, C and retrochinensin: a new antidepressant: 4-aryl-2,3- naphthalide lignans from *Justicia prostrata*. *Chem Ind* 23: 854-855.

Gordaliza M, Castro M.A, Del Corral JMM, San Feliciano A (2000). Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds. *Curr Pharm Design* 6: 1811-1839.

Guevara, H. A; Luengas, P. E, *et al.* (2010). Revisión documental de los productos naturales legalmente autorizados para su mercadeo en Colombia. *Colombia Médica*, vol 41:2-12.

Graham, V.A.W. (1988) a. Delimitation and infra-generic classification of *Justicia* (Acanthaceae). *Kew Bull.* 34: 351-624.

Graham, J; Quin, M, *et al.* (2000) b. Plants used against cancer-an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of ethnopharmacology* 73:347-377.

Himeji, M; Ohtsuki, T, *et al.* (2007). Difference of growth-inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis* producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell. *Cancer letters* 245:269-274.

Heo H, Shin Y, Cho W, Choi Y, Kim H, Kwon YK (2009). Memory improvement in ibotenic acid induced model rats by extracts of *Scutellaria baicalensis*. *J Ethnopharmacol.*; 122(1):20-7.

Herrera, A; González, I; *et al.* (2010). Evaluación in vitro de la citotoxicidad de algunos extractos obtenidos de *Kalanchoe* sp. en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino y próstata. "La Escalera" Ticomán México, D.F. C.P

Hokland, P. and Heron, I. (1980). Analysis of the lymphocyte distribution during Isopaque-Ficoll isolation of mononuclear cells from human peripheral blood. *J Immunol Methods*, 32: 31–39.

Huang X, Liu T, Gu J, Xiaomin L *et al.* (2001). 3D QSAR Model of flavonoids binding at benzodiazepine site in GABA_A Receptors. *J Med Chem*;44:1883-1891.

Hui, K.M; Huen, M.S, *et al.* (2002)a. Anxiolytic effect of wogonin, a benzodiazepine receptor ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgy. *Biochemical pharmacology* 64:1415-1424.

Hui HY, Chang CJ, McLaughlin JL, Powell GP (1986)b. Justicidin B, a bioactive trace lignan from the seeds of *Sesbania drummondii*. *J Nat Prod* 49: 1175-1176.

Iraizos, A. (2004). Informe final del diseño de una formulación de tabletas Tilo[®]100 mg. Informe técnico DTC/28. CIDEM.

Isolabella, M. P. (2005) Efectos de drogas citotóxicas sobre células HEp-2 y U-937(tesis de pregrado). Facultad de medicina, Universidad de Belgrano Buenos Aires Argentina.

Jaimes, G. *et al* (2006). Principio activo citotóxico de *Espeletia killipii* Cuatr. sobre células tumorales y su toxicidad frente a células normales humanas. Brazilian Journal of Pharmacognosy 16(2): 140-145.Universidad Nacional, Bogotá, Colombia.

Jarvis, A; Paternina, M.J, *et al.* (2006).Evaluación Rápida de la Adaptación al Medioambiente de plantas promisorias medicinales. CIAT. Cali, Colombia.

Jasemine, S; Shyam, S. R, *et al.* (2007) Hepatoprotective Effect of Crude Extract and Isolated Lignans of *Justicia simplex* Against CCl₄-Induced Hepatotoxicity. Pharmaceutical Biology. Pharmaceutical Chemistry Research Laboratory, Department of Pharmaceutics, Institute of Technology, Banaras Hindu University, Varanasi, India. Vol. 45, No. 4, pp. 274–277.

Jennings, T.A. (1993). Seminario de liofilización, Sociedad Internacional de Liofilización. Revisado el 24 de octubre de 2014 desde Internet:

<http://www.bdigital.unal.edu.co/7837/1/9789584444363.pdf>

Jeong, K. *et al.* (2011) Ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi prevents oxidative damage and neuroinflammation and memorial impairments in artificial senescence mice. Journal of Biomedical Science, 18: 1-14.

Jonas JM, Cohon MS. (1993). A comparison of the safety and efficacy of alprazolam versus other agents in the treatment of anxiety, panic and depression: a review of the literature. J Clin Psychiatry; 54:25-48.

Joseph, H; Gleye, J, *et al.* (1988). Justicidin B, a cytotoxic principle from *Justicia pectoralis*. Journal of Natural Products. 51: 599-600.

Joshee, N; Patrick, T. S, *et al.* (2002). Skullcap (*Scutellaria* species): a potential medicinal crop. ASHS Press, Alexandria, VA, SUA, 580-586 pp.

Kaplan, Sadock's (2002).Comprehensive Textbook of Psychiatry Lippincott Williams & Wilkins.

Kennedy D.O, Little W, Scholey A.B. (2004). Attenuation of laboratory- induced stress in humans after acute administration of *Melissa officinalis* (lemon balm). Psychosom Med; 66: 607-613.

- Kim ,B.R; Kim, D.H, *et al* . (2001)a. Effect of an extract of the root of *Scutellaria baicalensis* and its flavonoids on aflatoxin B1 oxidizing cytochrome P450 enzymes.Plant Med. 67(5):396-9.
- Kim, D.H., Jeon, S.J., Son, K.H., Jung, J.W., Lee, S., Yoon, B.H., Lee, J.J., Cho, Y.W., Cheong, J.H., Ko, K.H., Ryu, J.H. (2007)b. The ameliorating effect of oroxylin A on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Neurobiology of Learning and Memory* 87, 536–546.
- Kpoviessi S, Gbaguidi F, Gbenou J, Accrombessi G, Haddad M, Moudachirou M, Quetin-Leclercq J (2006). Allelopathic effects on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) plant and cytotoxic activities of sterols and triterpenes isolated from *Justicia anselliana* (NEES) T. Anders. *Electron J Nat Subs* 1: 12-19.
- Kirtikar, K.R. y Basu, B. D. (1975). *Indian Medicinal Plants*, Lalit Mohan Basu, 4, Leaders Road, Allahabad., 461.
- Lee, K.W; Kim, H. J, *et al*. (2007)a. Acteoside inhibits human promyelocytic HL-60 leukemia cell proliferation via inducing cell cycle arrest at G0/G1 phase and differentiation into monocyte.*Carcinogenesis*. 28: 1928–1936.
- Lee *et al*. (2011) b. Effects of S/B remedy containing *Scutellaria baicalensis* and *Bupleurum scorzonerifolium* on hepatic interleukin-6 related signal transducer and activator of transcription 3 activation in mice through cell-cell interaction. *Biol Pharm Bull*, 34(5): 727-33.
- Lee, H.H., Yang, L.L., Wang, C.C., Hu, S.Y., Chang, S.F., Lee, Y.H. (2003) c. Differential effects of natural polyphenols on neuronal survival in primary cultured central neurons against glutamate-and glucose deprivation-induced neuronal death. *Brain Research* 986, 103–113.
- Lee, T.K. *et al*. (2009) d. Pharmacological activity ingrowthin hibitionandapoptosis of cultured humanleiomyomal cells of tropical plant *Scutellaria barbata* D Don (Lamiaceae). *Environmental Toxicol- ogy and Pharmacology* 21, 70–79.
- León, C; Gomez, M, *et al*. (2006). Caracterizacion del perfil de sensibilidad de un panel de lineas celulares para valoracion de citotoxicidad *in vitro*. *Biomedica* (001): 161-168.
- Lin A.M, Ping Y.H, Chang G.F, Wang J.Y, Chiu J.H, Kuo C.D, Chi C.W. (2011). Neuroprotective effect of oral S/B remedy (*Scutellaria baicalensis* Georgi and *Bupleurum scorzonerifolium* Willd) on iron-induced neurodegeneration in the nigrostriatal dopaminergic system of rat brain. *J Ethnopharmacol.*;134(3):884- 91

Lino, C; Traveira, M.L; *et al.* (1997). Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq. and its main constituents: coumarin and umbelliferone. *Phytother Res*; 11(3):211-15.

Lomonte, B. (2009) Técnicas de Laboratorio en Inmunología Clínica. Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología Instituto Clodomiro Picado. Costa Rica. 122 pp. Disponible en internet: <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/> (Consulta 14 de febrero de 2015).

Marder M, Viola H, Wasowski C, Fernandez S *et al.* (2003). 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol Biochem Behav*;75:537-545.

Martínez M.C, Fernandez S.P, Loscalzo L.L, Wasowski C *et al.* (2009)a. Hesperidin, a flavonoid glycoside with sedative effect, decreases brain Per1/2 levels in mice. *Pharmacol Biochem Behav*;92:291-296.

Martinez, M; Ocampo, D; *et al.* (2011)b. Actividad antibacteriana y citotoxicidad *in vivo* de extractos etanolicos de *Bahuinia variegata* L. (Fabaceae). *Revista cubana de plantas Medicinales*. 16: 313-323.

Matsuda H, Ninomiya K, Shimoda H, Yoshikawa M (2002). Hepatoprotective principles from the flowers of *Tilia argentea* (Linden): Structure requirements of tiliroside and mechanisms of action. *Bioorg Med Chem*; 10: 707-712.

McCann UD, Thorne D, Hall M, *et al* (1995). The effects of L-Dihydroxyphenylalanine on alertness and mood in methyl-para-tyrosine-treated healthy humans: Further evidence for the role of catecholamines in arousal and anxiety. *Neuropsychopharmacol*; 13:41-52.

Ministerio de la Protección Social. 2008. *Vademecum Colombiano de Plantas Medicinales*. Bogotá, DC., Colombia. 246 Pp.

Montoya, H; Lemeshko,V. (2003). Actividad antioxidante de algunos extractos vegetales. *Vitae*, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica issn 0121-4004 Volumen 10 número 2, año. Universidad de Antioquia, Medellín - Colombia. págs. 72-79.

Morantes S.J., Páez A., Cordero C.P., Rincón J. and Aristizábal F.A.(2006). Actividad Citotóxica y Análisis Fitoquímico de Fracciones Aisladas del Extracto Etanólico total de *Acnistus arborescens*. Grupo Farmacogenética del Cáncer y Grupo Productos Bioactivos de Plantas Medicinales Colombianas, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Mu X, He G, Cheng Y, Li X, Xu B, Du G (2009). Baicalein exerts neuroprotective effects in 6-hydroxydopamine-induced experimental parkinsonism in vivo and in vitro. *Pharmacol Biochem Behav.*;92(4):642-8.

Navarro E, Alonso S.J, Trujillo J, Jorge E, Pérez C (2004). Central nervous activity of elenoside *Phytomedicine* 11: 498-503.

Olaniyi A.A (1980). Lignans from *Justicia flava*. *J Nat Prod* 43: 482-486.

Oliveira, A.F. and Andrade, L.H. (2000). Caracterização morfológica de *Justicia pectoralis* Jacq. e *J. gendarussa* Burm. F. (Acanthaceae). *Acta Amazonica*. 30(4): 569-578.

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2009). Medicina tradicional. En: 62ª Asamblea Mundial de la Salud, Ginebra. Resoluciones y decisiones, anexos. Ginebra, (WHA62/2009/REC/1; http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA62-REC1/WHA62_REC1-sp-P1.pdf, visitado el 3 de septiembre de 2013):19–21.

OMS. (2000). Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Ginebra, OMS. (documento de referencia WHO/EDM/TRM/2000.1).

Ordoñez A. J. (2009). Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico del extracto completo de sábila *Aloe vera*.

Ordoñez ,G.V. and Pineda,S.K. (2013). Contribución al conocimiento fitoquímico y evaluación biológica del extracto etanólico total de *Scutellaria incarnata* Vent. (Tesis de pregrado) Universidad del Cauca. Colombia.

Paladini A, Marder M, Medina J. 6-Bromo flavone. (1996). A high affinity ligands for the chemical benzodiazepine receptor is a member of family of active flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun*; 223:384-389.

Park H.G, Yoon S.Y, Choi J.Y, Lee G.S, Choi J.H, Shin C.Y, Son K.H, *et al.* (2007). Anticonvulsant effect of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis*. *Eur J Pharmacol*. Nov 28;574(2-3):112-9.

Parajuli, P., Joshee, N., Rimando, A., Mittal, S., Yadav, A.K. (2009) In vitro anti-tumor mechanisms of various *Scutellaria* extracts and constituent flavonoids. *Planta Med*. 75:41–48.

Perez *et al.*, (2010) a. A phase 1B dose escalation trial of *Scutellaria barbata* (BZL101) for patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat Clinical Trial*. 120:111–118.

Pérez, G.T; Rivero, Z.R, *et al.* (2001) b. Evaluación de la actividad antioxidante de *Justicia pectoralis* Jacq. Rev Biomed, 20: 30-33.

Petty F, Kramer GL, Fulton M, Moeller FG, Rush AJ. (1993). Low plasma GABA is a trait-like marker for bipolar illness. Neuropsychopharmacol; 9:125-32.

Quintero, A; Pelcastre, A; Dolores, J. (1999). Antitumoral activity of a new pyrimidine derivatives of sesquiterpene lactones. J Pharmal Sci 2: 108-112.

Rajakumar N and Shivanna M.B (2009). Ethno-medicinal application of plants in the eastern region of Shimoga district, Karnataka, India. J Ethnopharmacol 126: 64-73.

Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. Sensors (Basel, Switzerland). Sensors. 12:12347-12360.

Repetto, M. (2002). Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group .Tercera edición; p.303-305.

Rodríguez, C; Echevarria, I, *et al.* (2003) a.Fecha y distancia de plantación en el cultivo del tilo (*Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonard). Rev Cubana Plant Med.;8:1028-4796.

Rodríguez, J. E; López, O. D, *et al.* (2008) b. Obtención de una Materia Prima de Calidad Farmacéutica a partir de Extractos de *Justicia pectoralis* Jacq., mediante Secado por Aspersión. Desarrollo Tecnológico a partir de Extracto Hidroalcohólico al 30%. Latin American Journal of Pharmacy. 27(3): 333-338.

Sanabria, O. (2001). Manejo vegetal en agroecosistemas tradicionales de Tierradentro, Cauca, Colombia. (Editorial Universidad Del Cauca).

Sánchez, G.E; Fuentes, H. L, *et al.* (2003).Estudio farmacognóstico de *Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonard. Rev Cubana Plant Med, 8: 3-12.

Sanders C, Diego, M, Fernández M, *et al* (2002). EEG asymmetry responses to lavender and rosemary aromas in adults and infants. Intern J Neuroscience; 112: 1205-1220.

Sanmugapriya *et al.* (2005). Anti-inflammatory activity of *Justicia prostrata* gamble in acute and sub-acute models of inflammation. Inflammopharmacology. University of Madras, Tamil Nadu, India Vol. 13, No. 5–6, pp. 493–500.

Sarris J, Panossian A, *et al.* (2011). Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: A review of psychopharmacology and clinical evidence. *European Neuropsychopharmacology* 21:841-860.

Shang X, *et al.* (2010). The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review *Journal of Ethnopharmacology* 128 279–313

Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Vol 78 (convenio Andres Bello).

Shinella, G; Tournier, H, *et al.* (2002). Antioxidant Activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Science* 70:1023-1033.

Skaltsa, H.D; Lazari, D.M, *et al.*(2000). Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Scutellaria albida* ssp. *albida* from Greece. *Planta medica* 66:672-673.

Solarte H.M and Vásquez E. (2012). Determinación del efecto antiproliferativo apoptótico del extracto de Totumo *Crecentia cujete* en linfocitos humanos cultivados in vitro mediante el análisis de índice mitótico y citometría de flujo. (Tesis de pregrado). Universidad del Cauca, Colombia.

Sollozo, D. M.I; *et al.* (2011). *Medicina tradicional: estudios preclínicos de plantas con propiedades ansiolíticas*. Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México. Revisado el 18 de marzo de 2015 desde internet:

<http://www.medigraphic.com/elresidente>

Song, W. (1981). Studies on the resource of the Chinese herb *Scutellaria baicalensis* Georgy. *Acta Pharm Sin* 16:139-145.

Soria, E. A.; Quiroga, P. L; *et al.* (2014). Development of an Antioxidant Phytoextract of *Lantana grisebachii* with Lymphoprotective Activity against In Vitro Arsenic Toxicity. Hindawi Publishing Corporation *Advances in Pharmacological Sciences* Volume 2014, Article ID 416761, 7 pages. Universidad Nacional de Río Cuarto, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Stojakowska, A. y Kisiel, W. (1999). Secondary metabolites from a callus culture of *Scutellaria columnae*. *Fitoterapia*, 70: 324-325.

Takuo, O, *et al.*(1991). Chemistry and antioxidative effects of phenolic compounds from Licorice tea and composite and Labiate Herbs.15: 2.

Tan B.K.H and Vanitha J. (2004). Immunomodulatory and Antibacterial Effects of Some Traditional Chinese Medicinal Herbs: A Review. *Curr. Med. Chem.*, 11(11):1423-1430.

Tomimori, T., Imoto, Y. (1984). Studies on the constituents of *S. species V.* on the flavonoid constituents of "Ban Zhi Lian", the whole herb of *Scutellaria rivularis* Wall. *Yakugaku Zasshi* 38, 252–254.

Venâncio E.T; *et al.* (2010). Efectos ansiolíticos-como de extracto estandarizado de *Justicia pectoralis* (SEJP) en ratones: Participación de GABA / benzodiazepina de los receptores. Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Federal de Ceará, Fortaleza, Brasil.

Varalakshmi, K.N. *et al.* (2011). In Vitro Safety Assessment of the Effect of Five Medicinal Plants on Human Peripheral Lymphocytes. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* February; 10 (1): 33-40. University of Benin, Benin City, Nigeria.

Vasilev N.P, Ionkova I (2005). Cytotoxic activity of extracts from *Linum* cell cultures. *Fitoterapia* 76: 50-53.

Vásquez, O; Alba, A, *et al.* (2001). Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*). *Revista Amazónica de Investigación alimentaria* 1: 38- 42.

Wahi SP, Wahi AK, Kapoor R (1974). Chemical study of the leaf of *Justicia gendarussa* Burm. *JRIM* 9: 65-66.

Wang, H.H; Liao, J.F, *et al.* (2000). Anticonvulsant effect of water extract of *Scutellariae radix* in mice. *Journal of ethnopharmacology* 73:185-90.

Wolfman C, Viola H, Marder M, Wasowski C *et al.* (1996). Anxiolytic properties of 6,3'-dinitroflavone, a high-affinity benzodiazepine receptor ligand. *Eur J Pharm*;318:23-30.

Xiong Z, Jiang B, Wu PF, Tian J, Shi LL, Gu J, *et al* (2011). Antidepressant effects of a plant-derived flavonoid baicalein involving extracellular signal-regulated kinases cascade. *Biol Pharm Bull.*;34(2):253-9

Xu, X.F; Cai, B.L, *et al* (2011). Baicalin induces human mucoepidermoid carcinoma Mc3 cells apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Invest New Drugs*; 29:637-45.

Yaghmai, J.M. (1988). Volatile constituents of *Scutellaria lateriflora* L. *Flavour and fragrance journal* 3: 27-31.

Zargari, A. (1990). Medicinal Plant Iran Tehran University publications. 4:574-578.

Zhang, D.Y. *et al.* (2003) a. Inhibition of Cancer Cell Proliferation and Prostaglandin E₂ Synthesis by *Scutellaria Baicalensis*. *Cancer Research*. 63: 4037-4043.

Zhang, Z.J. (2004)b. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sci*. 75, 1659-1699.

Zhang, Z; Lian, X.Y, *et al.* (2009) c. Characterization of chemical ingredients and anticonvulsant activity of American skullcap (*Scutellaria lateriflora*). *Phytomedicine*.16,485-493.

Zhou, Z.H., Yang, C.R., 2000. Five new flavonoid glycosides from *Scutellaria amoena*. *Acta Botanica Yunnanica* 22, 475–481 (in Chinese).