

INTERFERENCIA DE PIGMENTOS VEGETALES AL APLICAR LA TÉCNICA XTT A EXTRACTOS DE *Buddleja globosa*, *Senecio tephrosioides* Turcz. Y *Equisetum giganteum*

INTERFERENCE OF PLANT PIGMENTS FOR THE APPLICATION OF XTT TECHNIQUE TO EXTRACTS OF *Buddleja globosa*, *Senecio tephrosioides turcz*, AND *Equisetum giganteum*

José Amiel-Pérez^{1,2,3}, Alejandro Fukusaki^{1,3}, Nathaly Enciso², Carlos Altamirano^{1,3}, Ana Mayanga^{1,2}, Álvaro Marcelo^{1,3} y Obert Marín-Sánchez^{1,3,4}

RESUMEN

La técnica XTT se utiliza frecuentemente para determinar la inhibición o estímulo del crecimiento celular, en la búsqueda de principios activos antitumorales o de sustancias utilizadas para lograr la expansión celular, por ejemplo, de las células madre. Cuando se aplica esta técnica para la extracción de metabolitos secundarios de plantas, los pigmentos interfieren en el proceso con resultados indeseables que conducen a errores. El objetivo de este trabajo es observar la presencia de pigmentos en los extractos de las plantas *Buddleja globosa* (matico), *Senecio tephrosioides* Turcz (huamanripa) y *Equisetum giganteum* (cola de caballo), obtenidos con distintos solventes y observados a 450 nm de longitud de onda indicada por la técnica XTT.

Se usaron diferentes solventes para la obtención de extractos: n-hexano, cloroformo, metanol y agua. El procedimiento experimental consistió en sembrar células madre mesenquimales de cuarto pasaje a una concentración de 5×10^3 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, y se añadieron extractos y suero fetal bovino (SFB), según correspondiera. Los cultivos se incubaron durante 24 y 48 horas. Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas a 450 nm de longitud de onda. Se aplicaron los procedimientos estadísticos test de Dunnett, ANOVA y la prueba t-Student. La diferenciación requiere valores de $p < 0.05$.

Los resultados obtenidos se resumen en las 8 figuras del presente trabajo en las que se observan los valores de densidad óptica (DO) obtenidos de las lecturas del cultivo de células madre

¹ INSTITUTO DE MEDICINA REGENERATIVA, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR. LIMA, PERÚ.

² LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR. LIMA, PERÚ.

³ LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR. LIMA, PERÚ.

⁴ ESCUELA DE MEDICINA HUMANA, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR. LIMA, PERÚ.

madre mesenquimales incubadas con diferentes concentraciones de extractos (10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 y 1280 µg/ml) para las tres plantas estudiadas. Estos resultados muestran que, en muchos casos, existen residuos de pigmentos de las tres plantas hasta en la última etapa del proceso. Los extractos metanólicos del control positivo (CP) *Bidens pilosa* incubados durante 24 y 48 horas presentaron siempre diferencias significativas con el blanco. No así los extractos de las plantas medicinales en estudio, solo lo hizo el extracto metanólico de *Buddleja globosa* a altas concentraciones (320, 640 y 1280mg/ml).

Se observa que, en general, los valores en DO obtenidos son más elevados en casi todas las muestras incubadas durante 48 horas que las que fueron incubadas durante 24 horas. Las lecturas espectrofotométricas de los extractos nos indican una zona libre de los pigmentos más comunes, que podría ser utilizada para el desarrollo de nuevas técnicas que permitan la evaluación de metabolitos secundarios con efecto expansivo o antitumoral en diversas plantas medicinales. La zona va de 574 a 586 nm.

Palabras clave: técnica XTT, pigmentos vegetales interferentes, plantas medicinales, *Buddleja globosa*, *Senecio tephrosioides* turcz, *Equisetum giganteum*

ABSTRACT

The XTT technique is often used to determine the inhibition or the stimulation of cell growth, in the search of antitumor active ingredients or substances used to make cellular expansion, for example stem cells. When this technique is applied to the extraction of plant secondary metabolites, pigments interfere in the process with undesirable outcomes leading to errors. The objective of this work is to observe the presence of pigments in the extracts of plants *Buddleja globosa* (matico), *Senecio tephrosioides* turcz (huamanripa) and *Equisetum giganteum* (cola de caballo), obtained with different solvents and measured at 450nm wavelength indicated by the XTT technique.

Different solvents were used for obtaining extracts: n-hexane, chloroform, methanol and water. The experimental procedure consisted of cultivating mesenchymal stem cells of fourth passage at a concentration of 5×10^3 cells/well in a 96-well plate; extracts and fetal bovine serum (SFB) were added as appropriate, and cultures were measured after 24 and 48 hours. The readings were conducted in a microplate reader at 450nm wavelength. The statistical procedures applied were the Dunnet test, ANOVA and t-Student test. The differentiation requires values of $p < 0.05$.

The results obtained are summarized in 8 figures of the present work showing the optical density (OD) values obtained from the readings of the culture of mesenchymal stem cells incubated with different concentrations of extracts (10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280µg/ml) for the three studied plants. These results show that in many cases there are residues of pigments of the three plants even in the last stage of the process. The methanolic extracts of the Positive

Control *Bidens pilosa* incubated at 24 and 48 hours always presented significant differences with the White Control. Nonetheless, the extracts of medicinal plants in the study, only *Buddleja globosa* appeared to have an effect at high concentrations of methanolic extract (320, 640 and 1280µg/ml).

It is shown that in general, the obtained values in OD are higher in almost all samples incubated at 48 hours than those at 24 hours. The spectrophotometric readings of extracts indicate the most common pigments-free zone which could be useful for the development of new techniques that allow the evaluation of secondary metabolites with expansive or antitumor effect in various medicinal plants. The area runs from 574 to 586nm.

Key words: technique XTT, interfering plant pigments, medicinal plants *Buddleja globosa*, *Senecio tephrosioides* turcz, *Equisetum giganteum*

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son fuentes importantes de principios activos que muestran efectos quimioterápicos, al inhibir el crecimiento de las células cancerosas (1, 2). También los extractos de estas plantas o sus metabolitos pueden ser muy útiles si contienen sustancias químicas capaces de estimular el crecimiento celular (3, 4, 5, 6). Se han llevado a cabo experiencias con el fin de remplazar con estos extractos al suero fetal bovino (SFB), un reconocido estimulante del crecimiento celular que se agrega al medio de cultivo. Este reemplazo se desea realizar por razones científicas y también éticas (7, 8). Las células madre podrían mutar y, con ello, modificar sus características originales, por acción del estimulante SFB que procede de un mamífero cuyo genoma es estructuralmente parecido al de los seres humanos (9).

Con el objetivo de verificar la inhibición o estímulo del crecimiento celular, se emplea la técnica XTT, aparentemente muy específica para el tema, práctica, rápida y de alto rendimiento, que utiliza un lector de microplacas con 96 pocillos para igual número de muestras (10). La técnica de coloración se basa en estudios fotocolorimétricos y se fundamenta en que la secreción enzimática de las mitocondrias celulares reacciona en contacto con el reactivo de la técnica XTT, coloreándose, pero se anula instantáneamente esta secreción al morir la célula. Por el contrario, con el crecimiento celular aumenta la intensidad de la coloración, que así mide la cantidad de células presentes en la muestra estudiada.

La prueba XTT detecta las células metabólicamente activas, las células vivas cuyas enzimas mitocondriales reducen las sales de tetrazolium del reactivo de color ligeramente amarillo a un compuesto de formazán de color naranja nítido (11), lo que se observa en el lector de microplacas a una longitud de 450-500 nanómetros, según recomendación de los proveedores de esta técnica (12). Naturalmente, la intensidad de este color naranja será proporcional a la cantidad de células vivas.

Los pigmentos vegetales, constituyentes de la mayoría de plantas, suelen estar presentes en los extractos preparados a partir de ellas (13) y su coloración puede ser diversa. Casi la totalidad de las hojas contienen clorofila, de color verde. Muchas otras, tienen beta-caroteno (color anaranjado), xantófilas (amarillo, ocre o pardo) y antocianinas (rojo, púrpura o azul). Las dos primeras se disuelven en alcohol metílico o etílico y en acetona, y las últimas, las antocianinas, son acuosolubles (14).

En un trabajo anterior se ha demostrado experimentalmente cómo los pigmentos vegetales de la *Bidens pilosa* (amor seco) pueden alterar los resultados de los procesos de medición, específicamente los de la técnica XTT, y su presencia en los extractos está condicionada por los solventes utilizados en su proceso de extracción (13).

La hipótesis de este trabajo es que los pigmentos están presentes en los extractos de las plantas medicinales en estudio y pueden afectar las lecturas realizadas con instrumentos basados en la medición de la intensidad de colores, como los espectrofotómetros, lectores de microplacas y otros.

El objetivo es observar la presencia de pigmentos en los extractos de las plantas *Buddleja globosa* (matico), *Equisetum giganteum* (cola de caballo) y *Senecio tephrosioides* Turcz. (huamanripa), obtenidos con distintos solventes y observados a 450 nm de longitud de onda correspondiente al color anaranjado indicado por la técnica XTT.

Posteriormente, intentar la eliminación o minimización de estos pigmentos en los extractos utilizando solventes y otros métodos de separación y aislamiento, que harán posible lograr mejores resultados en la medición e impedir probables falsos positivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Equisetum giganteum

Obtención de extracto seco con n-hexano (h)

Se pesaron 200 g de muestra seca y molida en una licuadora, y se extrajeron con 750 ml de n-hexano. Se filtró después de 48 horas.

El filtrado, a través de papel Whatman n.º 1 presentó un color verde cristalino. El remanente o “marco” que quedó en el papel filtro se maceró con 300 ml de n-hexano y se dejó macerando durante 24 horas; luego se filtró. Al marco se le realizó el mismo tratamiento anterior. Se repitió la operación tres veces más, con lo que se obtuvo un total de cinco extracciones. Se reunieron en uno solo los líquidos obtenidos y estos fueron concentrados, mediante el rotavapor, a 35 °C, hasta lograr un líquido viscoso de color verdoso. El remanente del solvente fue eliminado mediante baño maría a 40 °C, hasta lograr la sequedad.

Luego se dejó secando el marco durante 24 horas, en una fuente ubicada en una campana extractora, y finalmente se pesó el extracto seco, denominado H.

Obtención de extracto seco con cloroformo (Cl)

Luego, parte de este se extrajo con 750 ml de cloroformo y se dejó reposando durante 24 horas, para luego filtrarlo. La operación se repitió con la adición de 500 ml de cloroformo por cuatro veces más. El extracto se evaporó en el rotavapor a 40 °C hasta obtener un líquido muy viscoso de color verde oscuro. El remanente del solvente fue evaporado mediante baño maría a 40 °C, hasta sequedad. Se pesó y se le denominó extracto seco Cl.

Obtención del extracto seco con metanol (Met)

Parte del marco anteriormente obtenido fue tratado con 750 ml de metanol, se dejó macerando durante 24 horas y luego se filtró. La operación se repitió por cuatro veces y los filtrados se evaporaron en el rotavapor, siguiendo las mismas operaciones de las anteriores extracciones. El resultado fue una masa verdosa, un poco más clara que las anteriores, la que fue pesada.

Obtención del extracto acuoso (Aq)

El marco remanente fue tratado con 750 ml de agua y se repitieron las mismas operaciones anteriores por cinco veces.

Este extracto acuoso se tuvo que evaporar primero al rotavapor y luego al baño maría a 45 °C. Esta última operación de eliminación del agua demoró cinco días. Se pesó el extracto seco Aq.

Buddleja globosa

Se pesaron 200 g de muestra seca y molida en licuadora, se extrajo con 1750 ml de n-hexano y se filtró después de 48 horas.

El filtrado, a través de papel Whatman n.º 1, fue de color verde cristalino. Al remanente o “marco” se le agregaron 250 ml de n-hexano, se dejó macerando durante 24 horas y se filtró. Al marco se le realizó el mismo tratamiento anterior. Se repitió la operación tres veces más, con un total de 5 extracciones. Estas fueron concentradas mediante el rotavapor, a 35 °C, hasta obtener un líquido viscoso de color verde. El solvente remanente fue eliminado mediante baño maría a 40 °C, hasta lograr la sequedad. Luego se dejó al marco secando en una fuente al interior de una campana extractora por 24 horas.

Las plantas y sus extractos están compuestos por mezclas de muchos metabolitos secundarios. Esta secuencia de extracciones con diferentes solventes sobre el mismo marco hizo posible que este, por acción sucesiva de solventes de diferente polaridad, fuera perdiendo parcial o totalmente los distintos metabolitos (de acuerdo con su solubilidad). Los solutos residuales de cada solvente deberían disminuir en cada extracción o desaparecer. Esto no se puede determinar por una relación

causa-efecto porque diferentes variables independientes pueden tener el mismo efecto (variable dependiente). Para saber si quedó algo de una variable en el marco, es necesario efectuar una prueba de identificación química cuantitativa adicional.

Luego, se extrajo con 1750 ml de cloroformo, se dejó reposando durante 24 horas y se filtró. La operación se repitió adicionando 750 ml de cloroformo por cuatro veces más. El extracto se evaporó en el rotavapor a 40 °C, hasta obtener un líquido muy viscoso de color verde oscuro. El remanente del solvente fue evaporado mediante baño maría a 40 °C, hasta lograr la sequedad.

El marco fue tratado con 750ml de metanol y se dejó macerando por 24 horas; luego, se filtró. La operación se repitió cuatro veces y los filtrados reunidos se evaporaron en el rotavapor, siguiendo las mismas operaciones de las anteriores extracciones. El resultado fue una masa verdosa, un poco más clara que las anteriores.

El marco remanente fue tratado con 750 ml de agua y se repitieron cinco veces las mismas operaciones anteriores.

Este extracto acuoso se tuvo que evaporar, primero al rotavapor y luego al baño maría a 45 °C. La operación de eliminación del agua demoró siete días.

***Senecio tephrosioides* Turcz.**

Se pesaron 200 g de muestra seca y molida en una licuadora, que se extrajeron con 750 ml de n-hexano y se filtraron después de 48 horas.

El filtrado, a través de papel Whatman n.º 1, es de color amarillo verdoso. Al remanente o “marco” se le agregaron 500 ml de n-hexano, se dejó macerando

durante 24 horas y se filtró. Al marco se le realizó el mismo tratamiento anterior. Se repitió la operación tres veces más, con un total de 5 extracciones. Fueron concentradas mediante el rotavapor a 35 °C, hasta obtener un líquido verde viscoso. El solvente remanente fue eliminado mediante baño maría a 40°C, hasta lograr la sequedad.

Luego, se dejó secando el marco en una fuente, en la campana extractora por 24 horas.

A continuación, se le extrajo con 500 ml de cloroformo, se dejó reposando por 24 horas y se filtró. La operación se repitió con la adición de 500 ml de cloroformo por cuatro veces más. El extracto se evaporó en el rotavapor a 40 °C, hasta obtener un líquido muy viscoso de color verde amarillento. El remanente del solvente fue evaporado mediante baño

maría a 40 °C, hasta lograr la sequedad.

El marco fue tratado con 750 ml de metanol y se dejó macerando por 24 horas; luego, se filtró. La operación se repitió por cuatro veces y los filtrados juntados se evaporaron en el rotavapor, siguiendo las mismas operaciones de las anteriores extracciones. El resultado fue una masa marrón verdosa.

El marco remanente fue tratado con 750 ml de agua y se repitieron cinco veces las mismas operaciones anteriores.

Este extracto acuoso se tuvo que evaporar, primero al rotavapor y luego al baño maría a 45 °C. La operación de eliminación del agua demoró seis días.

Las cantidades de extractos obtenidas se muestran en el cuadro siguiente.

TABLA 1

| | <i>Buddleja globosa</i> (mg) | <i>Senecio tephrosioides</i> Turcz. (mg) | <i>Equisetum giganteum</i> (mg) |
|----------------|------------------------------|--|---------------------------------|
| Hexano (H) | 98,8 | 182,9 | 54 |
| Cloroformo(CI) | 77,4 | 82,3 | 128,3 |
| Metanol (Met) | 72,3 | 128,1 | 169,6 |
| Acuoso (Aq) | 102,4 | 116,5 | 92,2 |

CULTIVOS CELULARES. MEDICIÓN DE CRECIMIENTO O INHIBICIÓN

Células utilizadas

Con el fin de incluir el mayor número posible de variables en la prueba, se han utilizado células madre cuyo crecimiento o inhibición se va a estudiar.

Para este trabajo se emplearán células madre mesenquimales obtenidas del tejido adiposo humano de cuatro pasajes.

Proceso previo de los extractos

A partir del extracto, se preparó una muestra denominada solución madre (SM), cuya concentración fue de 2560 mg/ml, para cuyo efecto se pesaron 2,56mg del extracto que se disolvieron en 100 ml del solvente agua, en el caso de los extractos metanólicos y acuosos; cloroformo, en el caso del extracto de cloroformo, y n-hexano, en el caso del extracto de n-hexano. Esta SM se disolvió en 100 ml del solvente y se obtuvo una dosis de 1280 mg/ml,

y así sucesivamente hasta llegar a una concentración de 10 mg/ml.

Procedimiento de prueba

El procedimiento consistió en sembrar 5×10^3 en pocillos de una placa de 96; se añadieron los extractos y el suero fetal bovino (SFB), según correspondiera. Las lecturas se realizaron en el instrumento lector de microplacas a 450 nm de longitud de onda a las 24 horas (desde el día 0) y a las 48 horas.

Para los resultados solo se consideraron 60 pocillos; los de los bordes superior e inferior y laterales fueron referenciales.

Diseño y medios de cultivo

Se programaron pruebas de la experiencia y pruebas comparativas, que se muestran en las figuras 1 a 12 y se observan en los resultados.

1. Pruebas de la experiencia

Extractos en diferentes concentraciones, de menor a mayor: 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 y 1280 mg/ml. Total: 8 lecturas

2. Pruebas comparativas

- a. Pruebas blanco (PB): células madre mesenquimales más medio de cultivo (DMEM más 1% de estreptomycin/penicilina)
- b. Controles positivos (CP):
 - Con suero fetal bovino (SFB): 10% de SFB + medio de cultivo (DMEM + 1% de estreptomycin/penicilina) + células madre mesenquimales humanas. Para utilizarse cuando se realizan experiencias con el fin de reemplazar al SFB, como en este caso.

- *Bidens pilosa* (concentración 1280 mg/ml) + medio de cultivo (DMEM + 1% de estreptomycin/penicilina) + células madre mesenquimales humanas. Se emplea para comparar la clorofila de *B. pilosa* con las lecturas de otras plantas.

Medios de cultivo

MSC-H + MEDIO = células madre mesenquimales humanas + medio de cultivo (DMEM + 1% estreptomycin/penicilina)

MSC-H + MEDIO + 10% SFB = células madre mesenquimales humanas + medio de cultivo (DMEM + 1% estreptomycin/penicilina) + 10% SFB

MSC-H + MEDIO + 10% extracto = células madre mesenquimales humanas + medio de cultivo (DMEM + 1% estreptomycin/penicilina) + 10% extracto

Solventes

H = n-hexano; Cl = cloroformo; Met = metanólico y Aq = acuoso

RESULTADOS

En las figuras que se muestran a continuación se aprecia la absorbancia, expresada en densidad óptica (DO), cuando se utilizan células madre mesenquimales humanas (MSC-H) incubadas a 24 horas y 48 horas, al estudiar los extractos de *Buddleja globosa* (matico), *Senecio tephrosioides* (huamanripa) y *Equisetum giganteum* (cola de caballo) obtenidos con los solventes aplicados sucesivamente: n-hexano (H), cloroformo (Cl), metanol (Met) y agua (Aq), evaluados en concentraciones de 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 y 1280 mg/ml.

DENSIDAD ÓPTICA DE FRACCIONES DE *Buddleja globosa* OBTENIDAS POR SEPARACIÓN CON SOLVENTE N-HEXANO (H)

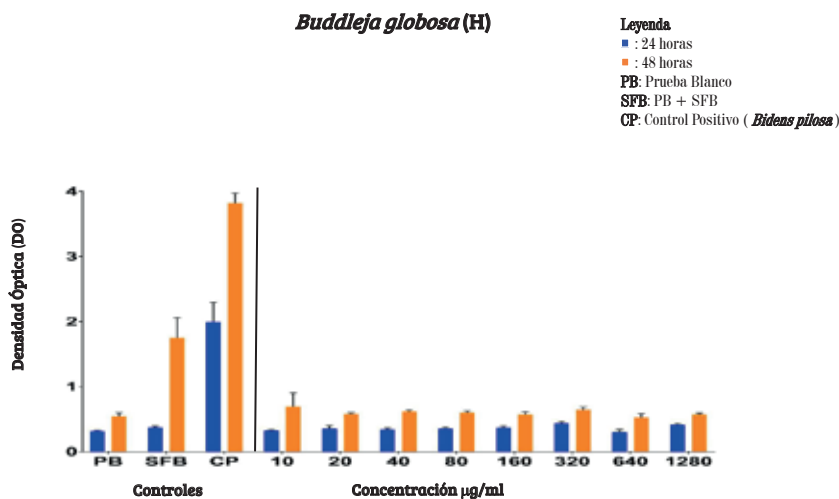


FIGURA 1. SE OBSERVA QUE LOS VALORES EN DO DE LOS EXTRACTOS DE LA PRUEBA SON SIMILARES A LA PB Y NO CONTIENEN CLOROFILA NI OTROS PIGMENTOS; EN NINGÚN CASO SON SEMEJANTES EN DO AL CP QUE SÍ CONTIENE PIGMENTOS. LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS DE 10 MG/ML DE LOS EXTRACTOS MUESTRAN UNA DO DE 0,7 AL INCUBAR DURANTE 48 HORAS, PERO LUEGO DECAEN, CON LO QUE DISMINUYE LIGERAMENTE LA DO.

DENSIDAD ÓPTICA DE FRACCIONES DE *Buddleja globosa* OBTENIDAS POR SEPARACIÓN CON SOLVENTE CLOROFORMO (Cl)

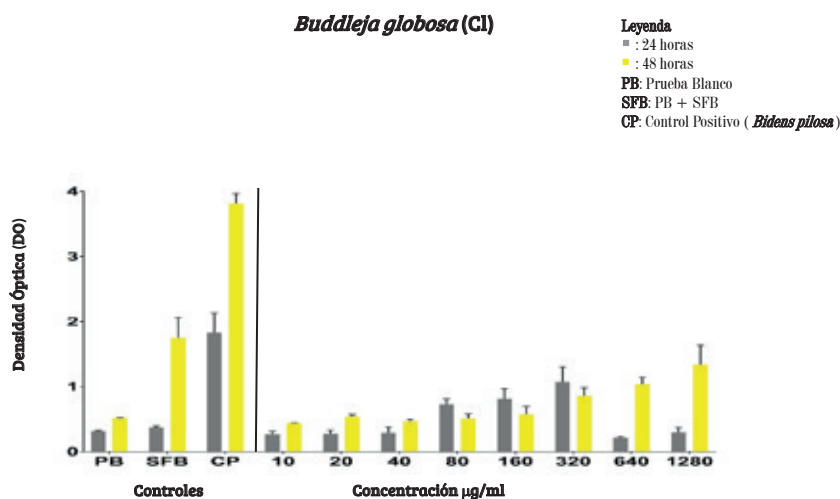


FIGURA 2. SE OBSERVA QUE LOS VALORES EN DO DE LOS EXTRACTOS DE LA PRUEBA, INCUBADOS A 24 HORAS, SON CRECIENTES DE 10 HASTA 320 MG/ML, PERO DECRECEN EN 640 Y 1280 MG/ML. ESTO ÚLTIMO PUEDE ATRIBUIRSE A LA ALTA CONCENTRACIÓN DE LOS PIGMENTOS VEGETALES Y LOS EXTRACTOS INCUBADOS A 48 HORAS PRESENTAN CRECIMIENTO CONTINUO DESDE 10 HASTA 1280 MG/ML TAL VEZ POR UNA POSIBLE CONTRIBUCIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR.

DENSIDAD ÓPTICA DE FRACCIONES DE *Buddleja globosa* OBTENIDAS POR SEPARACIÓN CON SOLVENTE METANOL (Met)

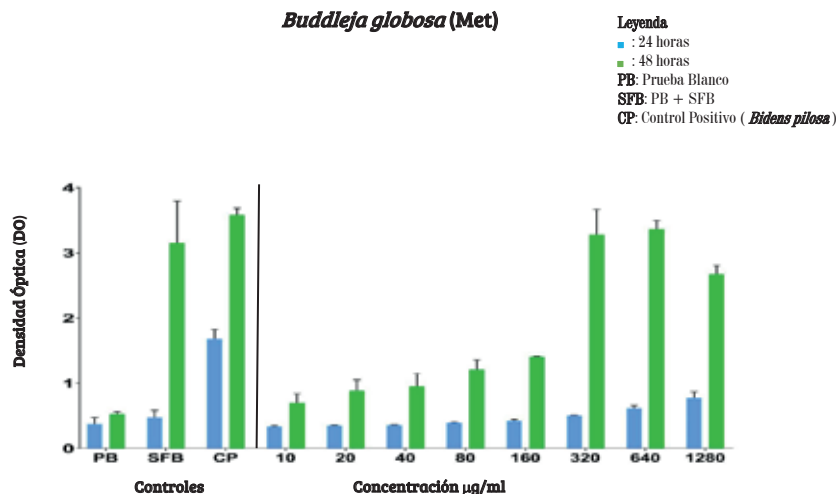


FIGURA 3. SE OBSERVA QUE LOS VALORES DE DO DE LAS MUESTRAS INCUBADAS A 48 HORAS SON CRECIENTES PROGRESIVAMENTE DE 10 HASTA 320 MG/ML, Y LUEGO HASTA 1280 MG/ML DECAEN. ESTO PUEDE ATRIBUIRSE A LOS PIGMENTOS VEGETALES Y, TAL VEZ, PARCIALMENTE A CRECIMIENTO CELULAR. LOS VALORES EN DO DE LAS MUESTRAS INCUBADAS A SOLO 24 HORAS SON SIEMPRE MENORES QUE A 48 HORAS Y SIEMPRE CON VALOR CRECIENTE DESDE 10 A 1280 MG/ML. EL METANOL ES UN BUEN DISOLVENTE DE LOS PIGMENTOS, A ELLO SE DEBE LA ALTA DO OBSERVADA.

DENSIDAD ÓPTICA DE FRACCIONES DE *Buddleja globosa* OBTENIDAS POR SEPARACIÓN CON SOLVENTE AGUA (Aq)

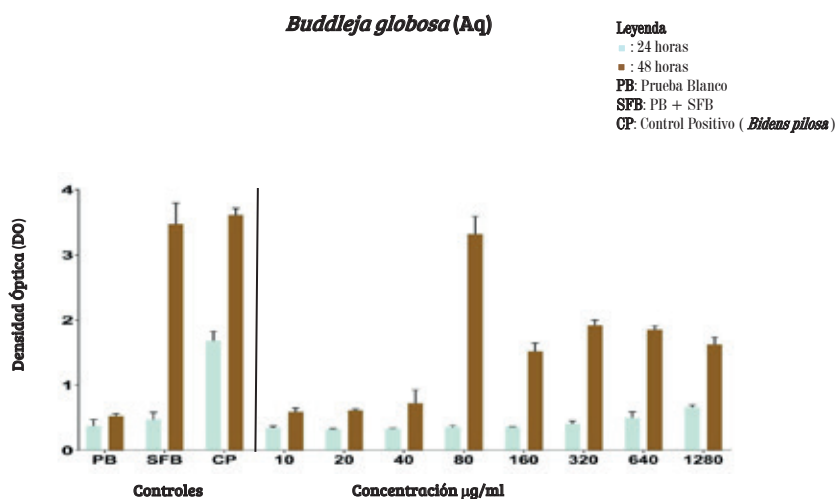


FIGURA 4. SE OBSERVA QUE LOS VALORES EN DO DE LOS EXTRACTOS SON IRREGULARES, AL INICIO A 10 MG/ML SON SIMILARES A LA PB Y A VECES A LA SFB QUE NO CONTIENEN CLOROFILA NI OTROS PIGMENTOS; PERO EN NINGÚN CASO SON SEMEJANTES EN DO AL CP, QUE SÍ CONTIENE PIGMENTOS. EL AGUA NO ES UN BUEN DISOLVENTE DE CLOROFILA, PERO SÍ DE ANTOCIANINAS. ADÉMÁS, ESTOS EXTRACTOS ACUOSOS PUDIERAN CONTENER RESIDUOS METANÓLICOS QUE SÍ SOLUBILIZAN PIGMENTOS.

DENSIDAD ÓPTICA DE FRACCIONES DE *Senecio tephrosioides* OBTENIDAS POR SEPARACIÓN CON SOLVENTE N-HEXANO (H)

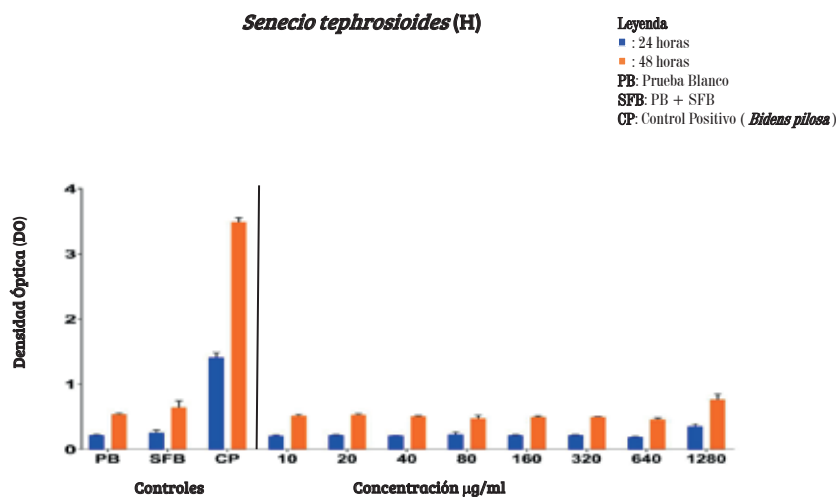


FIGURA 5. SE OBSERVA QUE LOS VALORES EN DO DE LOS EXTRACTOS DE LA PRUEBA SON MÍNIMOS, SIMILARES A LA PB. NO CONTIENE PIGMENTOS SIGNIFICATIVAMENTE INTERFERENTES.

DENSIDAD ÓPTICA DE FRACCIONES DE *Senecio tephrosioides* OBTENIDAS POR SEPARACIÓN CON SOLVENTE CLOROFORMO (Cl)

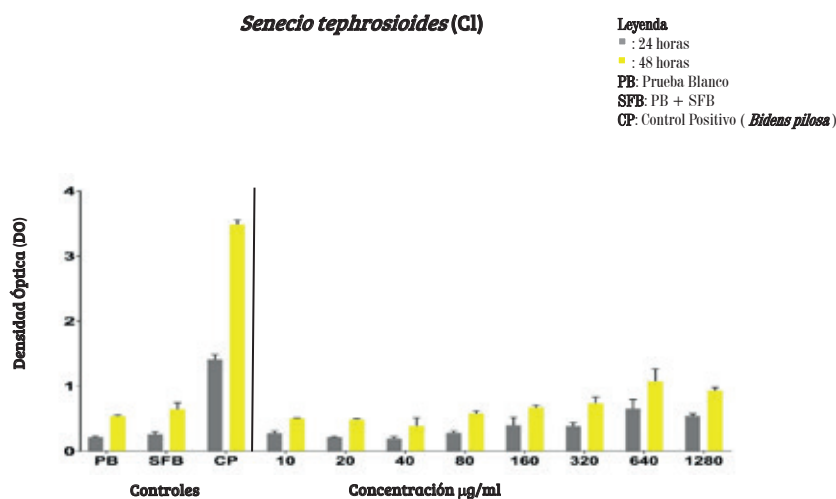


FIGURA 6. SE OBSERVA QUE LOS VALORES EN DO DE LOS EXTRACTOS DE 40 HASTA 640MG/ML INCUBADOS A 48 HORAS SON CRECIENTES EN FORMA DIRECTAMENTE PROPORCIONAL A LA CONCENTRACIÓN, PERO LUEGO DECAEN EN 1280MG/ML. SIN EMBARGO, ESTOS VALORES EN DO EN NINGÚN CASO SON SEMEJANTES AL CP, QUE SÍ CONTIENE PIGMENTOS, PERO SON SIEMPRE MENORES A 1,5.

DENSIDAD ÓPTICA DE FRACCIONES DE *Senecio tephrosioides* OBTENIDAS POR SEPARACIÓN CON SOLVENTE METANOL (Met)

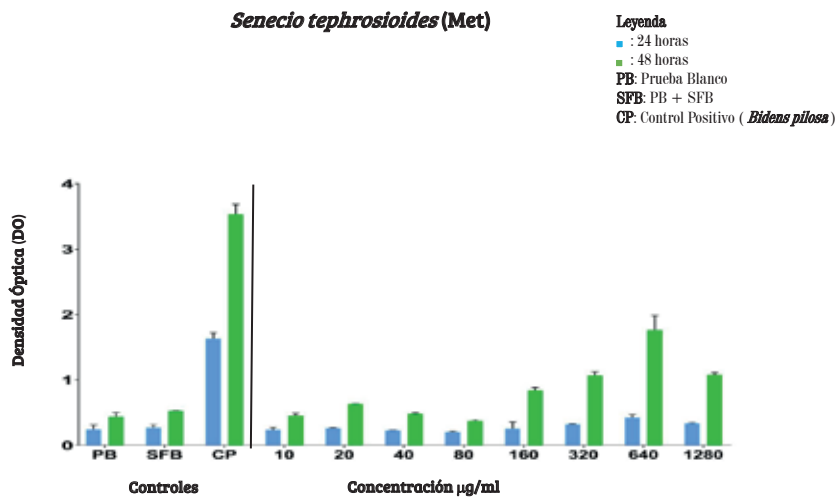


FIGURA 7. SE OBSERVA QUE LOS VALORES EN DO DE LOS EXTRACTOS DE 10 A 80 MG/ML SON IRREGULARES (A VECES, DECRECIENTES). LAS DO DE 80 A 640 MG/ML SON LAS ESPERADAS PARA EXTRACTOS CON PIGMENTOS, PERO DE MENOR INTENSIDAD QUE EN LAS DE LAS FIGURAS ANTERIORES, EXCEPTO EN LA DE 640 MG/ML. LA DO PRESENTA VALORES MÍNIMOS CUANDO SE INCUBA A 24 HORAS. SIEMPRE SIGUEN SIENDO MAYORES LOS VALORES EN DO CUANDO SE INCUBA A 48 HORAS

DENSIDAD ÓPTICA DE FRACCIONES DE *Senecio tephrosioides* OBTENIDAS POR SEPARACIÓN CON SOLVENTE AGUA (Aq)

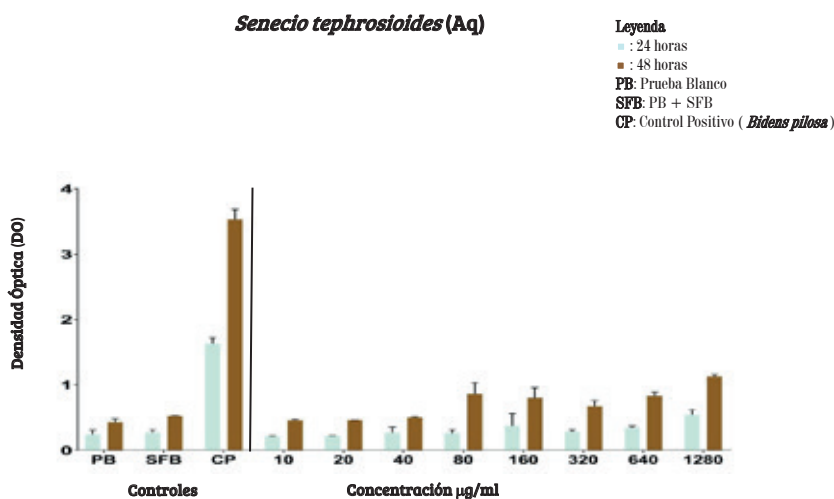


FIGURA 8. SE OBSERVA QUE LOS VALORES EN DO DE LOS EXTRACTOS SON IRREGULARES. LAS DO SIEMPRE SON MAYORES CUANDO SE INCUBA A 48 HORAS.

DENSIDAD ÓPTICA DE FRACCIONES DE *Equisetum giganteum* OBTENIDAS POR SEPARACIÓN CON SOLVENTE N-HEXANO (H)

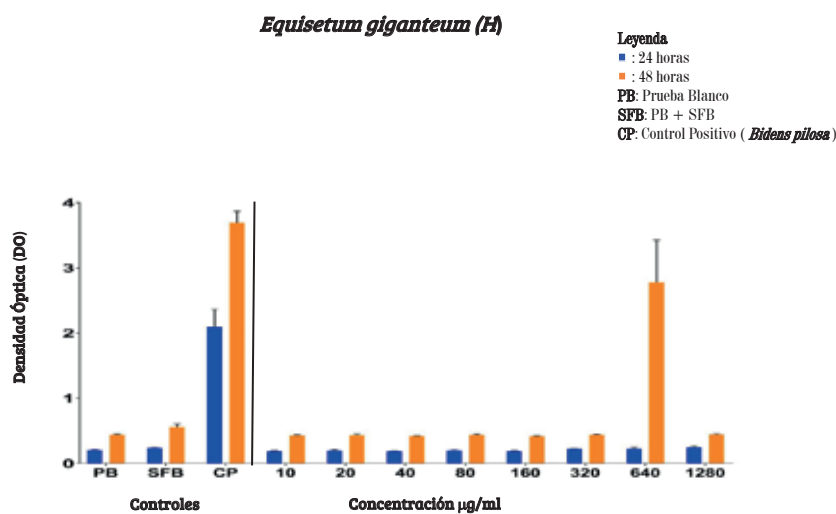


FIGURA 9. SE OBSERVA QUE LOS VALORES EN DO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE 10 MG/ML A 320 MG/ML SON SIMILARES A LOS DE LA PB, E INDICAN QUE NO HAY PRESENCIA DE PIGMENTOS. LAS DO A 640 Y 1280 MG/ML SON IRREGULARES Y, POR TANTO, DESCARTABLES.

DENSIDAD ÓPTICA DE FRACCIONES DE *Equisetum giganteum* OBTENIDAS POR SEPARACIÓN CON SOLVENTE CLOROFORMO (Cl)

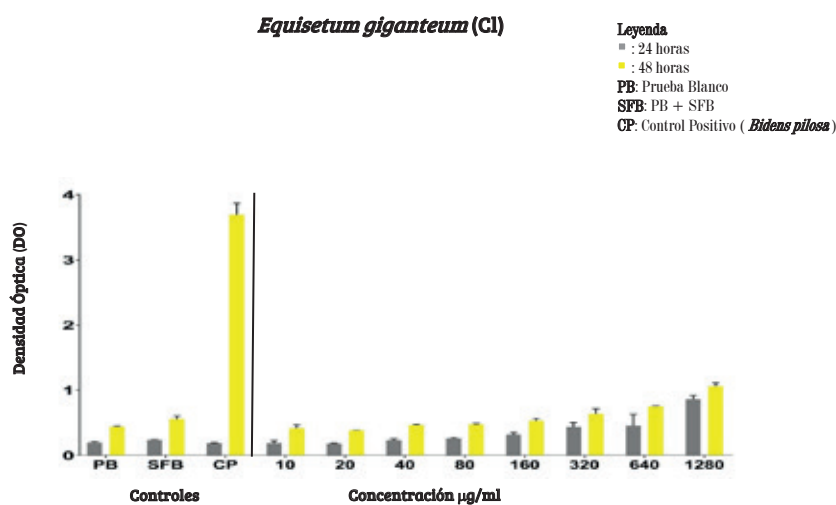


FIGURA 10. SE OBSERVA QUE LOS VALORES EN DO DE 20 A 1280 MG/ML SON CRECIENTES.

DENSIDAD ÓPTICA DE FRACCIONES DE *Equisetum giganteum* OBTENIDAS POR SEPARACIÓN CON SOLVENTE METANOL (Met)

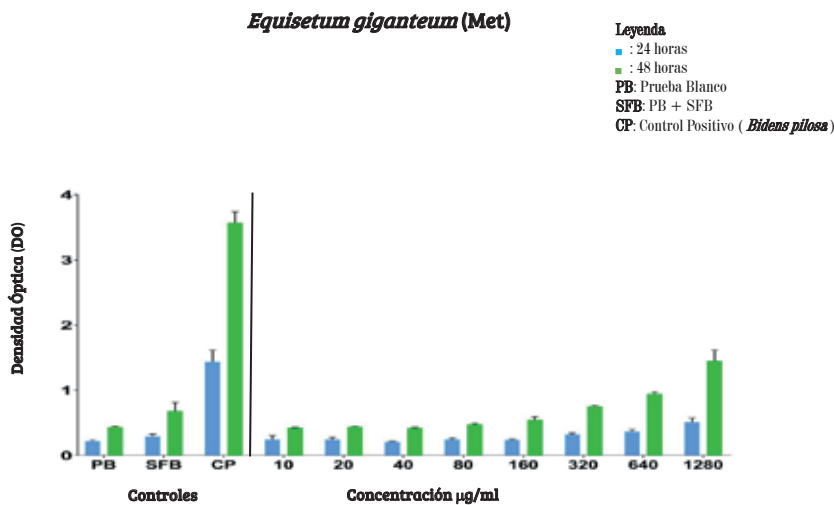


FIGURA 11. SE OBSERVA QUE LOS VALORES EN DO DE LOS EXTRACTOS A 10 Y 40 MG/ML SON SIMILARES A LA PRUEBA BLANCO. SIN EMBARGO, DE 80 A 1280 MG/ML AUMENTAN PROGRESIVA Y LIGERAMENTE, PERO EN NINGÚN CASO SON SIMILARES AL CP, AUNQUE SUFICIENTES PARA CONFIRMAR LA PRESENCIA DE PIGMENTOS SOLUBLES EN METANOL.

DENSIDAD ÓPTICA DE FRACCIONES DE *Equisetum giganteum* OBTENIDAS POR SEPARACIÓN CON SOLVENTE AGUA (Aq)

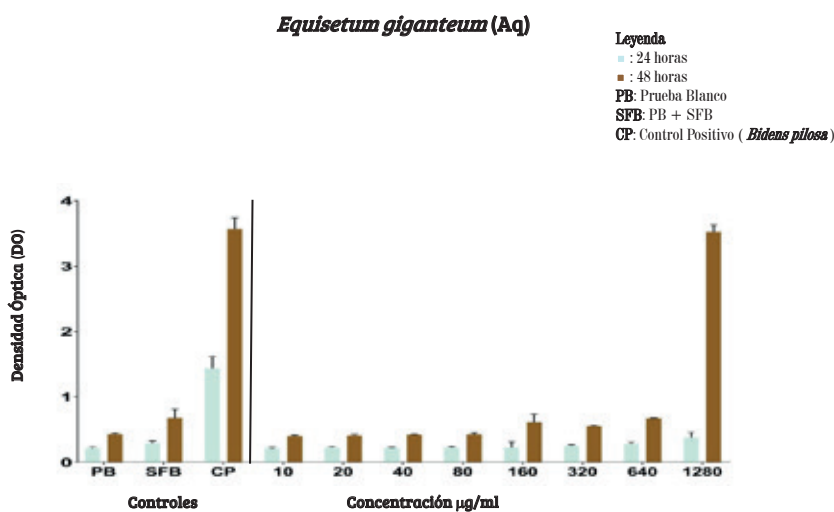


FIGURA 12. SE OBSERVA QUE LOS VALORES EN DO DE LOS EXTRACTOS DE 10 HASTA 1280 MG/ML INCUBADOS A 24 HORAS SON SIMILARES A LA PB. LOS EXTRACTOS INCUBADOS A 48 HORAS SON IRREGULARES, PARTICULARMENTE EL DE CONCENTRACIÓN DE 1280 MG/ML.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se usó el paquete estadístico Minitab 17 Statistical Software (2010) para la realización del análisis de varianzas ANOVA. Antes de realizar esta prueba, se verificaron los supuestos de normalidad (test de normalidad de Anderson-Darling) y varianza constante (prueba de Bartlett) para cada población. Se utilizó el test de Dunnett para realizar comparaciones de cada concentración de extracto (incluyendo los grupos con SFB y *Bidens pilosa*), con un control que en este caso es la prueba blanco. Para la comparación del tiempo de incubación, se usó la prueba t-Student y se asumieron varianzas iguales. El software usado fue Microsoft Excel 2013.

De acuerdo con los resultados obtenidos para los extractos de *Buddleja globosa*, el extracto que presentó mayor cantidad de diferencias significativas fue el metanólico, en el que se observaron lecturas significativamente diferentes a la prueba blanco en las concentraciones de 80, 160, 320, 640 y 1280 $\mu\text{g/ml}$, así como en el control positivo ($p < 0.05$, anexo II, tabla 1).

Para *Senecio tephrosioides*, se observó que el extracto hexánico no presentaba lecturas significativamente diferentes a la prueba blanco ($p > 0.05$, anexo II, tabla 2), excepto por la lectura a la concentración de 1280 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0.000$, anexo II, tabla 2). Además, se observaron diferencias significativas en las lecturas del extracto clorofórmico a las concentraciones de 320, 640 y 1280 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$, anexo II, tabla 2).

En el caso del extracto metanólico de *Equisetum giganteum*, el control positivo sí difirió significativamente de la prueba blanco ($p < 0.05$, anexo II, tabla 3) y, además, se observaron diferencias significativas en las concentraciones de

640 y 1280 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$, anexo II, tabla 3).

Se compararon los resultados obtenidos con los extractos metanólicos a 48 horas para las tres plantas utilizadas en este estudio: *Buddleja globosa*, *Equisetum giganteum* y *Senecio tephrosioides*. Se observó que las tres plantas presentan medias significativamente diferentes, especialmente en las concentraciones de 320, 640 y 1280 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$, anexo II, tabla 4)

Se compararon las medias de las lecturas obtenidas a 24 horas y 48 horas para cada concentración de cada extracto de las tres plantas (anexo II, tablas 5, 6 y 7). Mediante la prueba t-Student, se hallaron diferencias significativas entre las lecturas realizadas a 24 y 48 horas.

DISCUSIÓN

En esta experiencia se han efectuado extracciones de las tres plantas seleccionadas, *Buddleja globosa*, *Senecio tephrosioides* y *Equisetum giganteum*, utilizando para el efecto 4 solventes aplicados sucesivamente sobre el marco remanente, procedimiento que ya hemos empleado antes (15). Los solventes no polares n-hexano, cloroformo y los polares metanol y agua ofrecen diferentes características de solubilidad de los pigmentos interferentes. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo indican que en muchos casos estos actúan parcialmente dejando residuos de los pigmentos hasta en la última etapa del proceso, la extracción final con agua (ver fig. 4).

Se observa que, en general, los valores en DO obtenidos son más elevados en las muestras incubadas a 48 horas que las que fueron a 24 horas. Por tanto, el período de incubación recomendable es de 48 horas.

Los resultados muestran lo siguiente:

Los valores en DO obtenidos con el control positivo *Bidens pilosa* son significativamente más elevados. Esto evidencia que el contenido en pigmentos interferentes es mayor en esta planta.

El SFB se utiliza como estimulante del crecimiento celular e integra el medio de cultivo, lo que constituye parte de la prueba blanco (PB). También como medio de comparación, control positivo (CP), cuando lo que se busca es sustituirlo por otro u otros. En este estudio, será un control positivo y sus valores son menores que los que se obtienen con *B. pilosa*, pero similares a la mayoría de resultados que muestran las tres plantas mencionadas.

Evidentemente, las dosis (concentraciones de mg/ml) no son las mismas entre las tres plantas estudiadas ni con *B. pilosa*, como tampoco su linealidad referida a la presencia de pigmentos.

En alguna de estas pruebas se ha observado la presencia de hongos, lo que explicaría algunos resultados aberrantes (12). Se supone que la contaminación procede de las muestras mismas, ya que se ha trabajado la parte de cultivos celulares en cabina de flujo laminar ubicada en una sala diseñada para minimizar la contaminación microbiana. Se sugiere trabajar con las técnicas de higiene microbiológica desde la obtención de los extractos mismos, los que deben tratarse previamente para eliminar toda presencia de gérmenes, pasándolos por filtros adecuados (0.22 µm) o aplicándoles rayos ultravioletas, además de cumplir con las exigencias antes señaladas, así como las indicadas en estudios de metaanálisis referidas a este tema (16).

Se ha mostrado que el procedimiento de extracción por utilización sucesiva de diferentes solventes no elimina totalmente los pigmentos, pueden quedar remanentes en los extractos bajo tratamiento. Las pruebas blanco nos ayudan a conocer cuándo los pigmentos han sido totalmente extraídos, como ocurre con el extracto hexánico de *S. tephrosioides*. Deberá ensayarse con otras técnicas, además de las utilizadas a la fecha, que sean prácticas, sencillas, de bajo costo, de modo que hagan posible la investigación de principios activos en muchas plantas de la Amazonía aún no estudiadas.

No se explica el aumento de los valores de la densidad óptica (DO) cuando se comparan las pruebas de 24 horas con las de 48 horas de una misma muestra, lo que ocurre en todas las pruebas realizadas. Esto significaría crecimiento celular que en realidad no puede ocurrir con los pigmentos. Otra probabilidad es que exista estímulo celular por la presencia de metabolitos secundarios en los extractos. Una opción más sería una contaminación general de todas las pruebas.

Los gráficos espectrofotométricos nos indican zonas con picos interesantes libres de pigmentos, que pueden ensayarse con otras y nuevas técnicas a desarrollar para cuando se trabaje con plantas en la búsqueda de metabolitos secundarios que inhiban o estimulen el crecimiento celular.

En el anexo I, figuras 13, 14, 15 y 16, se muestran las gráficas de *Bidens pilosa*, *Buddleja globosa*, *Senecio tephrosioides* y *Equisetum giganteum* en las que se observa, en los cuatro casos, picos a los 665 nm de longitud de onda que corresponden al pigmento clorofila. Se destaca, además, el tramo que va de 574 a 586 por sus valores

mínimos en DO, que puede ser utilizado para desarrollar técnicas de medición con sustancias químicas, como las sales de tetrazolium, cuya coloración final se ajusta a este tramo sin, prácticamente, la interferencia de los más importantes pigmentos, clorofilas a y b, -caroteno y xantófilas. Al respecto se han efectuado y publicado múltiples ensayos con las sales de tetrazolium (17, 18, 19, 20, 21, 22).

Las pruebas estadísticas han confirmado nuestros resultados positivos con un nivel de significancia de 0,05 al aplicar las técnicas de análisis de varianza (ANOVA), de Dunet y Fisher. Anexo II. Solo *Bidens pilosa* (control positivo) cumple con valores de $p < 0.05$ para establecer una diferencia significativa entre las medias cuando se comparan con la prueba blanco, particularmente cuando se incuba a 48 horas y las extracciones se realizan con el solvente metanol, en el que son solubles los pigmentos vegetales más comunes e importantes. En segundo lugar se ubica el extracto de *Buddleja globosa*.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Mg. Javier Enciso Gutiérrez, del Laboratorio de Cultivo Celular de la Universidad Científica del Sur, por la contribución brindada al presente trabajo.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por la Universidad Científica del Sur.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ, Ueno H, Nanterment PG, Guy RK *et al.* Total synthesis of taxol. *Nature* 1994; 367: 630-4.
2. Cui J, Nan KJ, Tian T, Guo YH, Zhao N, Wang L. Chinese medicinal compound delisheng has satisfactory anti-tumor activity, and is associated with up-regulation of endostatin in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 in three-dimensional cultura. *World J Gastroenterol* 2007; 3(41): 5432-39.
3. Amiel-Pérez J, Enciso N, Guija E, Fukusaki A, Reátegui O, Domínguez F, Enciso J. Plantas medicinales peruanas con efectos antitumorales y estimulantes de la expansión de células madre. *Paradigmas* 2013; 11(18): 61-8.
4. Liu ZJ, Zhuge Y, Velásquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2009; 106: 984-91.
5. Baer PC, Griesche N, Luttmann W, Schubert R, Luttmann A, Geiger H. Human adipose-derived mesenchymal stem cells *in vitro*: evaluation of an optimal expansion medium preserving stemness. *Cytotherapy* 2010; 12(1): 96-106.
6. Kuhbier JW, Weyand B, Sorg H, Radtke C, Vogt PM, Reimers K. Stem cells from fatty tissue: A new resource for regenerative medicine? *Chirurg.* 2010; 81(9): 826-32.
7. G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *Altex* 2003;20(4):275-81.
8. Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *Altex* 2010; 27(1): 53-62
9. Enciso N, Amiel-Pérez J, Guija E, Fukusaki A, Reátegui O, Enciso J. Obtención de extractos de plantas que estimulan la proliferación de una línea humana de células madre mesenquimales. *Científica* 2011; 8(2): 89-97.
10. Lam HW, Lin H CH, Lao S CH, Gao JL, Hong SJ, Leong CHW *et al.* The angiogenic effects of *Angelica sinensis* extracto on HUVEC in vitro and zebrafish in vivo. *J. Cell. Biochem.* 2008; 103: 195-211.
11. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH *et al.* Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in cultura using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988; 48: 4827-33.
12. ATCC, XTT Cell Proliferation Assay Kit. Instruction Manual
13. Fukusaki A, Amiel-Pérez J, Enciso N, Marcelo A, Altamirano C, Amiel R, Marín-Sánchez O, Enciso J. Técnica XTT: pigmentos interferentes en fracciones de extracto metanólico de *Bidens pilosa*. *Científica* 2015; 12(3): 182-204

14. Yang Z, Zhai W. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2010; 11(8): 169-76.
15. Enciso J, Amiel-Pérez J, Guija-Poma E, Fukusaki A, Reátegui O, Amiel-Peña D, Enciso N, Valdivia E, Rodríguez R, Neyra K, Cano A. Efectos sobre la proliferación de fibroblastos y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de plantas medicinales peruanas. *Científica* 2008; 5(3/4): 164-76.
16. Amiel-Pérez J, Enciso N, Fukusaki A, Amiel-Sáenz J. Metaanálisis de experiencias o inhibición celular intentada con extractos de plantas y verificada mediante la técnica XTT. *Científica* 2014; 11(3): 207-16.
17. Berridge M, Herst P, Tan A. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* 2005; 11: 127-52.
18. Hatzinger P, Palmer P, Smith R, Penarrieta C, Yoshinari T. Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *J Microbiol Methods*. 2003; 52: 47-58.
19. Tunney M, Ramage G, Field T, Moriarty T, Storey D. Rapid colorimetric assay for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1879-81.
20. Lopez-Amoros R, Castel S, Comas-Riu J and Vives-Rego J. Assessment of *E. coli* and *Salmonella* viability and starvation by confocal laser microscopy and flow cytometry using rhodamine 123, DiBAC4(3), propidium iodide, and CTC. *Cytometry* 1997; 29(4): 298-305.
21. Yamaguchi N, Sasada M, Yamanaka M, Nasu M. Rapid detection of respiring *Escherichia coli* O157: H7 in apple juice, milk, and ground beef by flow cytometry. *Cytometry* 2003; 54A: 27-35.
22. Vallejo V, Habib Y, Roldán Fabio. Aplicación de sales de tetrazolio de nueva generación (XTT) para la estimación de la densidad de microorganismos degradadores de hidrocarburos empleando la técnica del número más probable. *Acta Biológica Colombiana* 2010; 15(3): 75-89.

RECIBIDO: 10/02/2015
ACEPTADO: 28/03/2016

AUTOR: JOSÉ AMIEL PÉREZ
CORRESPONDENCIA: jamielp@cientifica.edu.pe

ANEXO I: ESPECTROFOTOMETRÍA

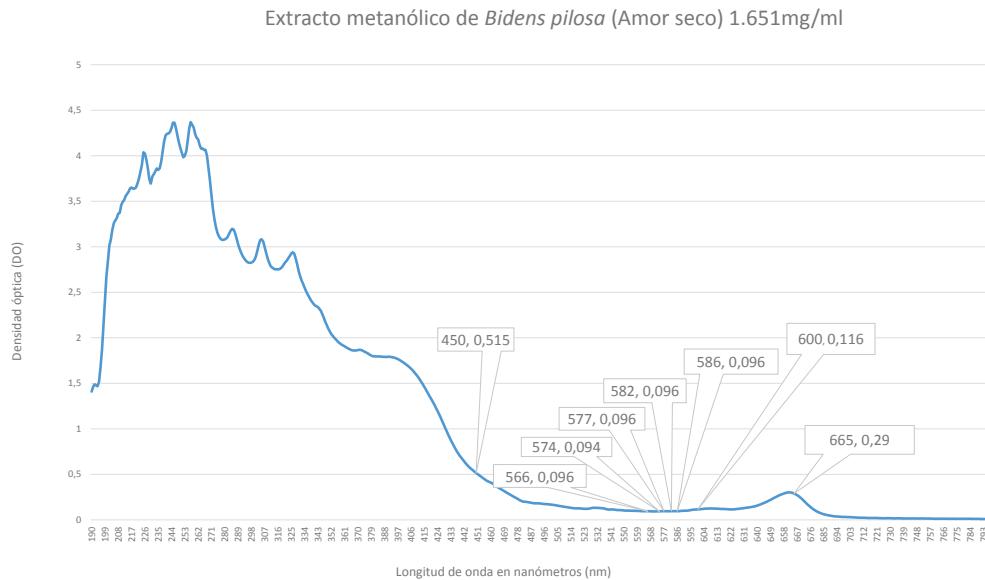


FIGURA 13. SE OBSERVA UN PICO EN 665 NM DE LONGITUD DE ONDA, CARACTERÍSTICO DE LA CLOROFILA. A 450 NM, LA ABSORBANCIA ES MAYOR QUE LA DE 665 NM. EN LA ZONA QUE VA DE 574 A 586, LOS VALORES DE DO SON MÍNIMOS.

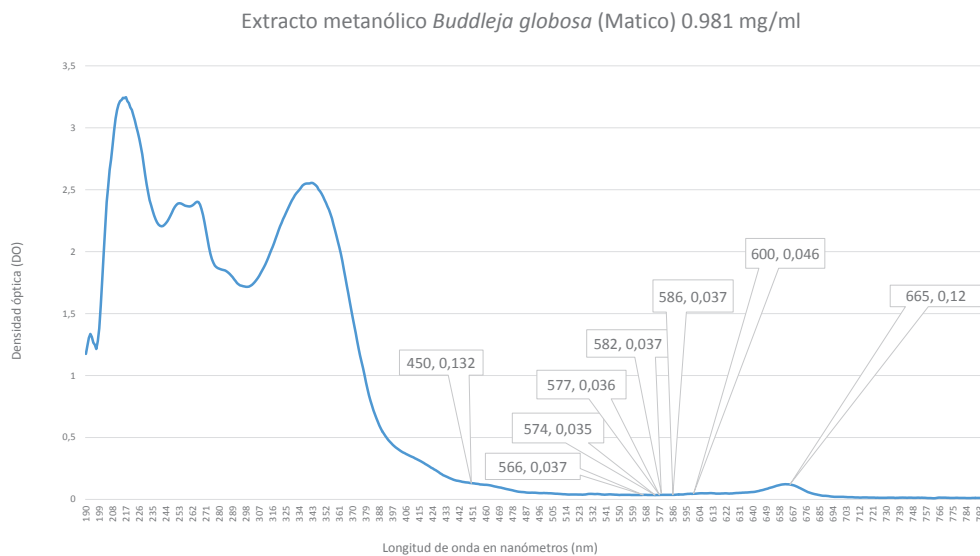


FIGURA 14. COMO EN LA FIGURA ANTERIOR, SE OBSERVA UN PICO EN LA LONGITUD DE ONDA DE 665 NM, PERO SU VALOR ES MENOR A LA DE 450 NM. LA ZONA DE MÍNIMO REGISTRO IGUALMENTE VA DE 574 A 586 NM.

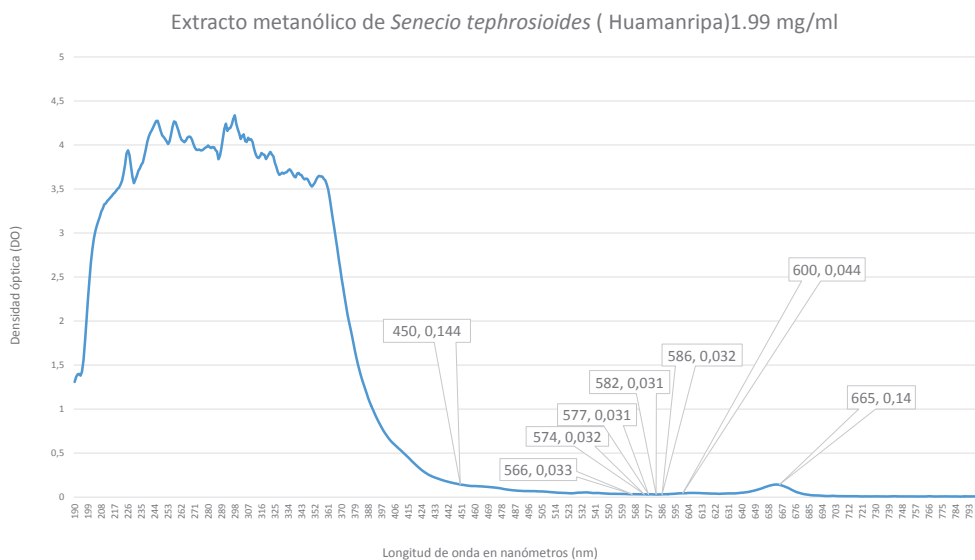


FIGURA 15. CON *S. TEPHROSIODES* TAMBIÉN SE OBSERVA EL PICO CARACTERÍSTICO DE CLOROFILA A 665 NM Y LOS VALORES MÍNIMOS DE DO IGUALMENTE CORRESPONDEN A LA ZONA QUE VA DE 574 A 586. LA ABSORBANCIA EXPRESADA EN DO ES SIMILAR EN LONGITUD DE ONDA 450 NM A LA DEL PICO A 665 NM.

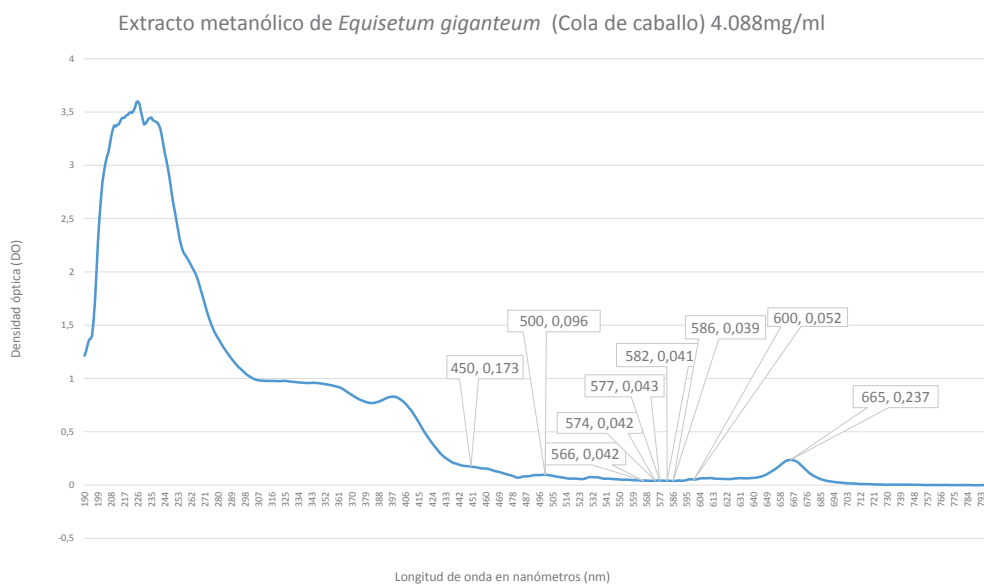


FIGURA 16. EL PICO A 665 NM, DE CLOROFILA, ES SORPRESIVAMENTE MAYOR AL DE LA LECTURA USUAL A 450 NM DE LONGITUD DE ONDA. LA ZONA DE MÍNIMA DO VA DE 566 A 586 NM.

ANEXO II: RESULTADOS ESTADÍSTICOS

TABLA 1. VALORES-P DE COMPARACIONES DE LA PRUEBA BLANCO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 4 EXTRACTOS DE **BUDBLEJA GLOBOSA** A 24 Y 48 HORAS (TEST DE DUNNET).

| | Buddleja globosa | | | | | | | |
|----------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | H | | Cl | | M | | A | |
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| 10 mg/ml | 1,000 | 0,478 | 0,999 | 0,955 | 0,997 | 0,946 | 1,000 | 0,998 |
| 20 mg/ml | 0,999 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,290 | 0,982 | 0,988 |
| 40 mg/ml | 1,000 | 0,972 | 1,000 | 0,997 | 1,000 | 0,137 | 0,993 | 0,111 |
| 80 mg/ml | 0,998 | 0,997 | 0,001 | 1,000 | 1,000 | 0,004 | 1,000 | 0,000 |
| 160 mg/ml | 0,990 | 1,000 | 0,000 | 1,000 | 0,952 | 0,000 | 1,000 | 0,000 |
| 320 mg/ml | 0,450 | 0,881 | 0,000 | 0,044 | 0,160 | 0,000 | 0,993 | 0,000 |
| 640 mg/ml | 1,000 | 1,000 | 0,872 | 0,001 | 0,001 | 0,000 | 0,170 | 0,000 |
| 1280 mg/ml | 0,665 | 1,000 | 1,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| <i>Bidens pilosa</i> | | | | | 0,000 | 0,000 | | |
| SFB | 0,983 | 0,000 | 0,999 | 0,000 | 0,400 | 0,000 | 0,887 | 0,000 |

Los valores de p menores a 0,05 indican diferencias significativas con respecto a la media de la prueba blanco para todos los extractos de *Buddleja globosa*. H: fracciones obtenidas por separación con solvente n-hexano, Cl: fracciones obtenidas por separación con solvente cloroformo, M: fracciones obtenidas por separación con solvente metanol, A: fracciones obtenidas por separación con solvente agua.

TABLA 2. VALORES-P DE COMPARACIONES DE LA PRUEBA BLANCO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 4 EXTRACTOS DE **SENECIO TEPHROSOIDES** A 24 Y 48 HORAS (TEST DE DUNNET).

| | Senecio tephrosioides | | | | | | | |
|----------------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | H | | Cl | | M | | A | |
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| 10 mg/ml | 1,000 | 0,997 | 0,742 | 0,998 | 1,000 | 1,000 | 0,999 | 1,000 |
| 20 mg/ml | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,980 | 0,999 | 0,025 | 1,000 | 1,000 |
| 40 mg/ml | 1,000 | 0,983 | 1,000 | 0,125 | 1,000 | 0,986 | 1,000 | 0,897 |
| 80 mg/ml | 0,998 | 0,519 | 0,621 | 0,994 | 0,945 | 0,939 | 1,000 | 0,000 |
| 160 mg/ml | 1,000 | 0,887 | 0,002 | 0,184 | 1,000 | 0,000 | 0,189 | 0,000 |
| 320 mg/ml | 1,000 | 0,873 | 0,005 | 0,016 | 0,253 | 0,000 | 0,992 | 0,006 |
| 640 mg/ml | 0,917 | 0,203 | 0,000 | 0,000 | 0,001 | 0,000 | 0,431 | 0,000 |
| 1280 mg/ml | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,126 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| <i>Bidens pilosa</i> | | | | | 0,000 | 0,000 | | |
| SFB | 0,312 | 1,000 | 0,955 | 0,428 | 0,994 | 0,698 | 1,000 | 0,719 |

Los valores de p menores a 0,05 indican diferencias significativas con respecto a la media de la prueba blanco para todos los extractos de *Senecio tephrosioides*. H: fracciones obtenidas por separación con solvente n-hexano, Cl: fracciones obtenidas por separación con solvente cloroformo, M: fracciones obtenidas por separación con solvente metanol, A: fracciones obtenidas por separación con solvente agua.

TABLA 3. VALORES-P DE COMPARACIONES DE LA PRUEBA BLANCO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 4 EXTRACTOS DE *EQUISETUM GIGANTEUM* A 24 Y 48 HORAS (TEST DE DUNNET).

| | <i>Equisetum giganteum</i> | | | | | | | |
|----------------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | H | | Cl | | M | | A | |
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| 10 mg/ml | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,998 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| 20 mg/ml | 0,980 | 1,000 | 0,980 | 0,832 | 0,998 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| 40 mg/ml | 1,000 | 1,000 | 0,763 | 0,999 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| 80 mg/ml | 1,000 | 1,000 | 0,072 | 0,972 | 0,998 | 0,991 | 1,000 | 1,000 |
| 160 mg/ml | 1,000 | 1,000 | 0,000 | 0,300 | 1,000 | 0,387 | 1,000 | 0,036 |
| 320 mg/ml | 1,000 | 1,000 | 0,000 | 0,001 | 0,127 | 0,000 | 0,983 | 0,265 |
| 640 mg/ml | 1,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,016 | 0,000 | 0,773 | 0,002 |
| 1280 mg/ml | 0,980 | 0,740 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,015 | 0,000 |
| <i>Bidens pilosa</i> | | | | | 0,000 | 0,000 | | |
| SFB | 0,998 | 0,974 | 0,588 | 0,078 | 0,510 | 0,003 | 0,583 | 0,000 |

Los valores de p menores a 0,05 indican diferencias significativas con respecto a la media de la prueba blanco para todos los extractos de *Equisetum giganteum*. H: fracciones obtenidas por separación con solvente n-hexano, Cl: fracciones obtenidas por separación con solvente cloroformo, M: fracciones obtenidas por separación con solvente metanol, A: fracciones obtenidas por separación con solvente agua.

TABLA 4. VALORES-P DE LA COMPARACIÓN DE MEDIAS DE CADA CONCENTRACIÓN DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE *BUDDLEJA GLOBOSA*, *SENECIO TEPHROSIODES* TURCZ. Y *EQUISETUM GIGANTEUM* Y CONTROLES POSITIVOS (*BIDENS PILOSA* Y MEDIO CON SFB) CON RESPECTO A LA PRUEBA BLANCO.

| | <i>Bidens pilosa</i> | SFB | 10 mg/ml | 20 mg/ml | 40 mg/ml | 80 mg/ml | 160 mg/ml | 320 mg/ml | 640 mg/ml | 1280 mg/ml |
|------------------------------|----------------------|-------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| <i>Buddleja globosa</i> | 0,000 | 0,000 | 0,946 | 0,290 | 0,137 | 0,004 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| <i>Senecio tephrosioides</i> | 0,000 | 0,698 | 1,000 | 0,025 | 0,986 | 0,939 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| <i>Equisetum giganteum</i> | 0,000 | 0,003 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,991 | 0,387 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

TABLA 5. PRUEBA T-STUDENT PARA LOS VALORES OBTENIDOS A 24 Y 48 HORAS PARA LOS CUATRO EXTRACTOS DE *BUDDLEJA GLOBOSA*.

| | Hexano | | Cloroformo | | Metanólico | | Acuoso | |
|-------------------------------------|-----------|----------|------------|----------|------------|----------|-----------|----------|
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| Media | 0,489361 | 0,951167 | 0,577583 | 1,031083 | 0,554889 | 1,856139 | 0,516361 | 1,697389 |
| Varianza | 0,218706 | 0,881176 | 0,267681 | 0,893508 | 0,138612 | 1,499782 | 0,139706 | 1,347533 |
| Observaciones | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 |
| Varianza agrupada | 0,549941 | | 0,580595 | | 0,819197 | | 0,743619 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | |
| Grados de libertad | 70 | | 70 | | 70 | | 70 | |
| Estadístico t | -2,642028 | | -2,525091 | | -6,099621 | | -5,810600 | |
| P(T<=t) dos colas | 0,010159 | | 0,013835 | | 0,000000 | | 0,000000 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 1,994437 | | 1,994437 | | 1,994437 | | 1,994437 | |

Se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias entre 24 y 48 horas, es decir, existen diferencias significativas entre las lecturas realizadas a 24 y 48 horas para los cuatro extractos de *Buddleja globosa*.

TABLA 6. PRUEBA T-STUDENT PARA LOS VALORES OBTENIDOS A 24 Y 48 HORAS PARA LOS CUATRO EXTRACTOS DE *EQUISETUM GIGANTEUM*.

| | Hexano | | Cloroformo | | Metanólico | | Acuoso | |
|-------------------------------------|-----------|----------|------------|----------|------------|----------|-----------|----------|
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| Media | 0,327583 | 0,787111 | 0,420694 | 0,879944 | 0,388333 | 0,967444 | 0,407278 | 0,888083 |
| Varianza | 0,111873 | 0,688405 | 0,113669 | 0,674349 | 0,150218 | 0,776508 | 0,152448 | 0,706907 |
| Observaciones | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 |
| Varianza agrupada | 0,400139 | | 0,394009 | | 0,463363 | | 0,429678 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | |
| Grados de libertad | 70 | | 70 | | 70 | | 70 | |
| Estadístico t | -3,082072 | | -3,104075 | | -3,609419 | | -3,111962 | |
| P(T<=t) dos colas | 0,002939 | | 0,002754 | | 0,000572 | | 0,002690 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 1,994437 | | 1,994437 | | 1,994437 | | 1,994437 | |

Se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias entre 24 y 48 horas con un nivel de significancia menor a 0,05, es decir, existen diferencias significativas entre las lecturas realizadas a 24 y 48 horas para los cuatro extractos de *Equisetum giganteum*.

TABLA 7. PRUEBA T-STUDENT PARA LOS VALORES OBTENIDOS A 24 Y 48 HORAS PARA LOS CUATRO EXTRACTOS DE *SENECIO TEPHROSOIDES*

| | Hexano | | Cloroformo | | Metanólico | | Acuoso | |
|-------------------------------------|-----------|----------|------------|----------|------------|----------|-----------|----------|
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| Media | 0,366444 | 0,909694 | 0,322639 | 0,820944 | 0,376806 | 0,878556 | 0,346361 | 1,011250 |
| Varianza | 0,284727 | 1,176057 | 0,040257 | 0,807376 | 0,114673 | 0,767986 | 0,116258 | 1,336609 |
| Observaciones | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 |
| Varianza agrupada | 0,730392 | | 0,423816 | | 0,441329 | | 0,726433 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | |
| Grados de libertad | 70 | | 70 | | 70 | | 70 | |
| Estadístico t | -2,696857 | | -3,247454 | | -3,204367 | | -3,309691 | |
| P(T<=t) dos colas | 0,008762 | | 0,001789 | | 0,002039 | | 0,001478 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 1,994437 | | 1,994437 | | 1,994437 | | 1,994437 | |

Se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias entre 24 y 48 horas con un nivel de significancia menor a 0,05, es decir, existen diferencias significativas entre las lecturas realizadas a 24 y 48 horas para los cuatro extractos de *Senecio tephrosioides*.

ANEXO III

TABLA 8. VALORES DE DENSIDAD ÓPTICA (DO) (MEDIAS \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR) DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *B. GLOBOSA*.

| | H 24 h | H 48 h | Cl 24 h | Cl 48 h | Met 24 h | Met 48 h | Aq 24 h | Aq 48 h |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| PB | 0,316 \pm 0,010 | 0,539 \pm 0,053 | 0,316 \pm 0,006 | 0,557 \pm 0,076 | 0,373 \pm 0,102 | 0,524 \pm 0,042 | 0,373 \pm 0,102 | 0,524 \pm 0,042 |
| SFB | 0,369 \pm 0,025 | 1,742 \pm 0,319 | 0,369 \pm 0,025 | 1,742 \pm 0,319 | 0,474 \pm 0,111 | 3,153 \pm 0,641 | 0,474 \pm 0,111 | 3,474 \pm 0,321 |
| CP | | | | | 1,682 \pm 0,143 | 3,582 \pm 0,104 | | |
| 10 mg/ml | 0,325 \pm 0,013 | 0,693 \pm 0,206 | 0,268 \pm 0,046 | 0,437 \pm 0,029 | 0,337 \pm 0,012 | 0,696 \pm 0,141 | 0,346 \pm 0,024 | 0,588 \pm 0,063 |
| 20 mg/ml | 0,35 \pm 0,049 | 0,575 \pm 0,018 | 0,275 \pm 0,054 | 0,532 \pm 0,037 | 0,351 \pm 0,007 | 0,884 \pm 0,169 | 0,327 \pm 0,010 | 0,608 \pm 0,033 |
| 40 mg/ml | 0,342 \pm 0,02 | 0,617 \pm 0,021 | 0,288 \pm 0,092 | 0,469 \pm 0,029 | 0,355 \pm 0,007 | 0,952 \pm 0,197 | 0,333 \pm 0,008 | 0,725 \pm 0,204 |
| 80 mg/ml | 0,355 \pm 0,027 | 0,596 \pm 0,029 | 0,726 \pm 0,082 | 0,505 \pm 0,072 | 0,397 \pm 0,009 | 1,206 \pm 0,152 | 0,359 \pm 0,021 | 3,319 \pm 0,273 |
| 160 mg/ml | 0,365 \pm 0,031 | 0,571 \pm 0,038 | 0,81 \pm 0,158 | 0,571 \pm 0,126 | 0,425 \pm 0,019 | 1,406 \pm 0,008 | 0,356 \pm 0,006 | 1,517 \pm 0,130 |
| 320 mg/ml | 0,432 \pm 0,03 | 0,64 \pm 0,04 | 1,07 \pm 0,233 | 0,856 \pm 0,124 | 0,502 \pm 0,007 | 3,282 \pm 0,388 | 0,412 \pm 0,039 | 1,923 \pm 0,080 |
| 640 mg/ml | 0,298 \pm 0,043 | 0,521 \pm 0,058 | 0,209 \pm 0,023 | 1,034 \pm 0,107 | 0,614 \pm 0,045 | 3,364 \pm 0,133 | 0,501 \pm 0,090 | 1,853 \pm 0,065 |
| 1280 mg/ml | 0,412 \pm 0,018 | 0,57 \pm 0,018 | 0,293 \pm 0,073 | 1,336 \pm 0,299 | 0,778 \pm 0,091 | 2,672 \pm 0,136 | 0,661 \pm 0,039 | 1,629 \pm 0,109 |

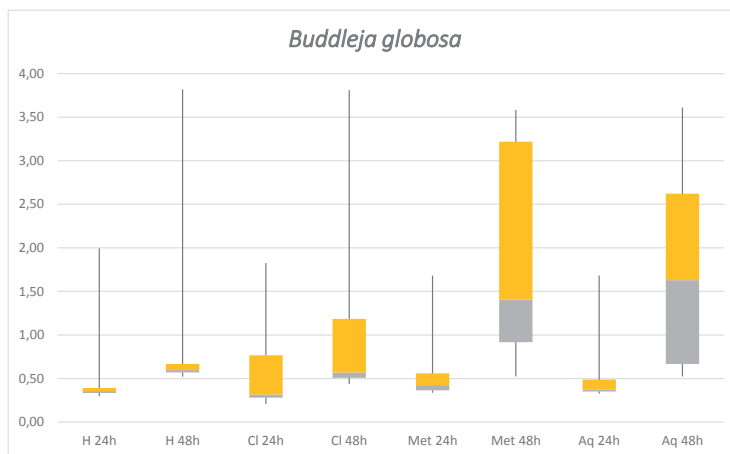
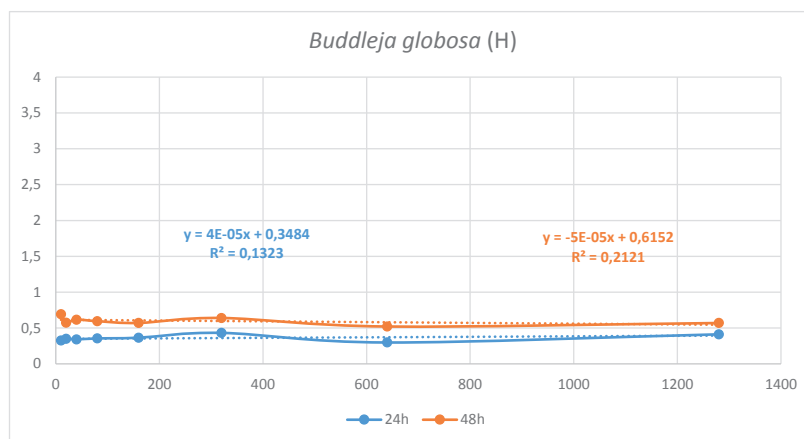
FIGURA 17. BOX-PLOT DE LOS DIVERSOS EXTRACTOS DE *B. GLOBOSA*.

FIGURA 18. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO HEXÁNICO VERSUS LA DENSIDAD ÓPTICA A 24 Y 48 HORAS DE INCUBACIÓN.

Interferencia de pigmentos vegetales al aplicar la técnica XTT a extractos de *Buddleja globosa*, *Senecio tephrosioides* Turcz. Y *Equisetum giganteum*

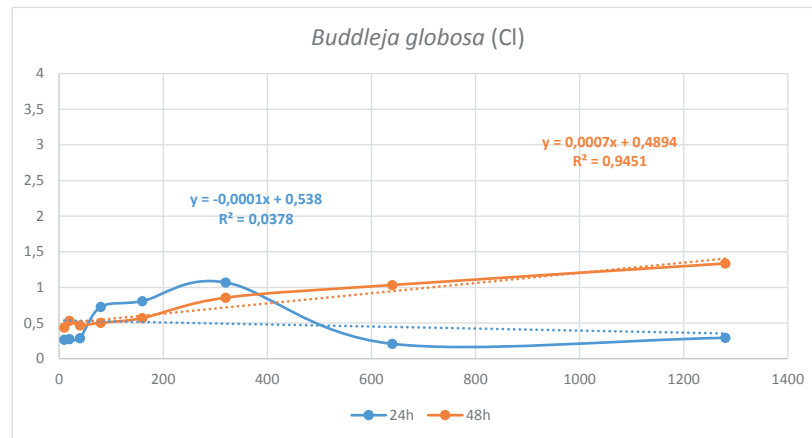


FIGURA 19. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO CLOROFÓRMICO VERSUS LA DENSIDAD ÓPTICA A 24 Y 48 HORAS DE INCUBACIÓN.

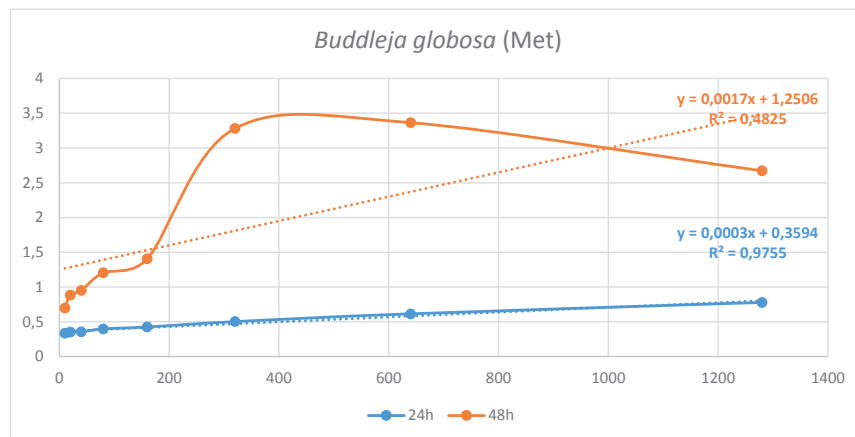


FIGURA 20. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO METANÓLICO VERSUS LA DENSIDAD ÓPTICA A 24 Y 48 HORAS DE INCUBACIÓN.

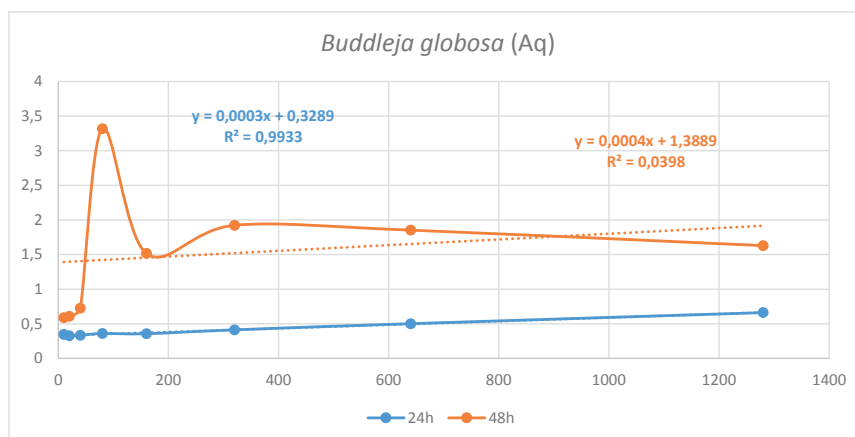


FIGURA 21. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ACUOSO VERSUS LA DENSIDAD ÓPTICA A 24 Y 48 HORAS DE INCUBACIÓN.

TABLA 9. VALORES DE DENSIDAD ÓPTICA (DO) (MEDIAS \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR) DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *SENECIO TEPHROSIODES*.

| | H 24 h | H 48 h | Cl 24 h | Cl 48 h | Met 24 h | Met 48 h | Aq 24 h | Aq 48 h |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| PB | 0,215 \pm 0,014 | 0,536 \pm 0,02 | 0,215 \pm 0,014 | 0,536 \pm 0,02 | 0,242 \pm 0,068 | 0,434 \pm 0,055 | 0,242 \pm 0,068 | 0,434 \pm 0,055 |
| SFB | 0,258 \pm 0,04 | 0,643 \pm 0,101 | 0,258 \pm 0,04 | 0,643 \pm 0,101 | 0,269 \pm 0,051 | 0,524 \pm 0,004 | 0,269 \pm 0,051 | 0,524 \pm 0,004 |
| CP | | | | | 1,632 \pm 0,092 | 3,536 \pm 0,152 | | |
| 10 mg/ml | 0,207 \pm 0,009 | 0,514 \pm 0,021 | 0,277 \pm 0,033 | 0,500 \pm 0,01 | 0,235 \pm 0,039 | 0,452 \pm 0,04 | 0,211 \pm 0,008 | 0,460 \pm 0,015 |
| 20 mg/ml | 0,217 \pm 0,007 | 0,528 \pm 0,023 | 0,214 \pm 0,010 | 0,486 \pm 0,014 | 0,263 \pm 0,009 | 0,634 \pm 0,008 | 0,215 \pm 0,006 | 0,463 \pm 0,002 |
| 40 mg/ml | 0,208 \pm 0,004 | 0,508 \pm 0,008 | 0,194 \pm 0,029 | 0,388 \pm 0,123 | 0,227 \pm 0,005 | 0,483 \pm 0,014 | 0,268 \pm 0,088 | 0,505 \pm 0,008 |
| 80 mg/ml | 0,227 \pm 0,039 | 0,479 \pm 0,042 | 0,284 \pm 0,027 | 0,577 \pm 0,04 | 0,203 \pm 0,011 | 0,371 \pm 0,016 | 0,266 \pm 0,053 | 0,866 \pm 0,169 |
| 160 mg/ml | 0,213 \pm 0,009 | 0,497 \pm 0,014 | 0,402 \pm 0,117 | 0,672 \pm 0,035 | 0,258 \pm 0,098 | 0,84 \pm 0,045 | 0,373 \pm 0,190 | 0,802 \pm 0,157 |
| 320 mg/ml | 0,216 \pm 0,006 | 0,496 \pm 0,006 | 0,387 \pm 0,051 | 0,735 \pm 0,096 | 0,325 \pm 0,007 | 1,065 \pm 0,059 | 0,284 \pm 0,034 | 0,673 \pm 0,088 |
| 640 mg/ml | 0,192 \pm 0,009 | 0,46 \pm 0,024 | 0,654 \pm 0,142 | 1,072 \pm 0,191 | 0,425 \pm 0,048 | 1,76 \pm 0,229 | 0,346 \pm 0,023 | 0,833 \pm 0,057 |
| 1280 mg/ml | 0,354 \pm 0,039 | 0,765 \pm 0,085 | 0,540 \pm 0,036 | 0,930 \pm 0,047 | 0,339 \pm 0,008 | 1,078 \pm 0,034 | 0,541 \pm 0,080 | 0,1,129 \pm 0,033 |

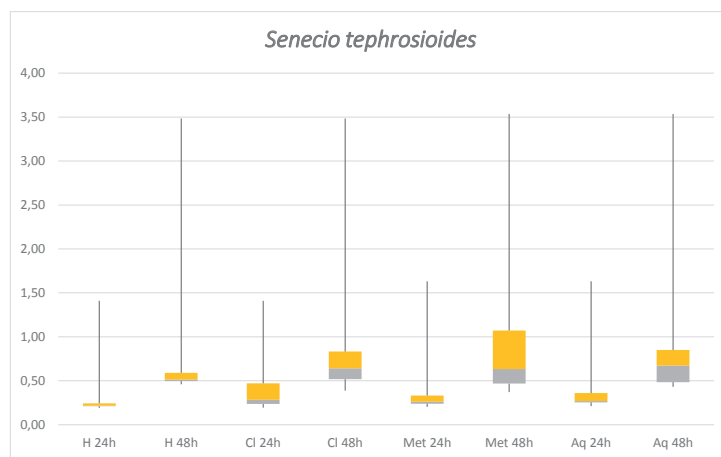


FIGURA 22. BOX-PLOT DE LOS DIVERSOS EXTRACTOS DE *S. TEPHROSIODES*.

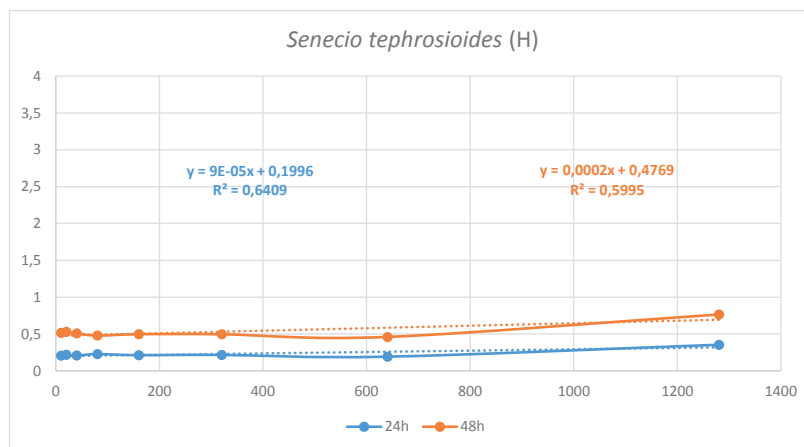


FIGURA 23. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO HEXÁNICO VERSUS LA DENSIDAD ÓPTICA A 24 Y 48 HORAS DE INCUBACIÓN.

Interferencia de pigmentos vegetales al aplicar la técnica XTT a extractos de *Buddleja globosa*, *Senecio tephrosioides* Turcz. Y *Equisetum giganteum*

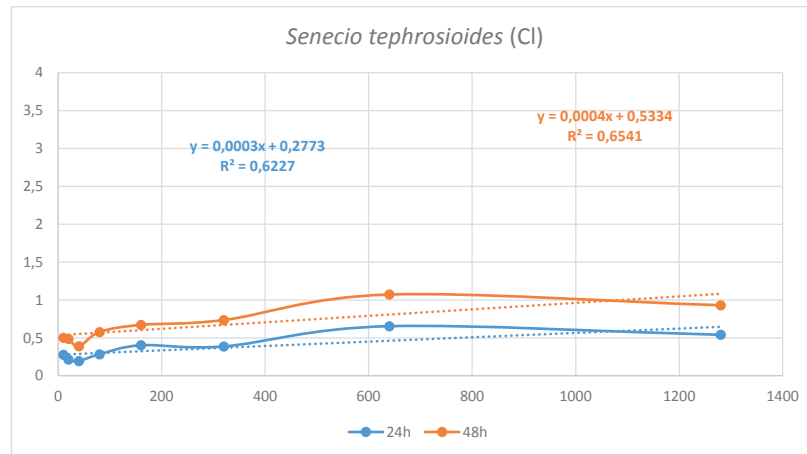


FIGURA 26. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ACUOSO VERSUS LA DENSIDAD ÓPTICA A 24 Y 48 HORAS DE INCUBACIÓN.

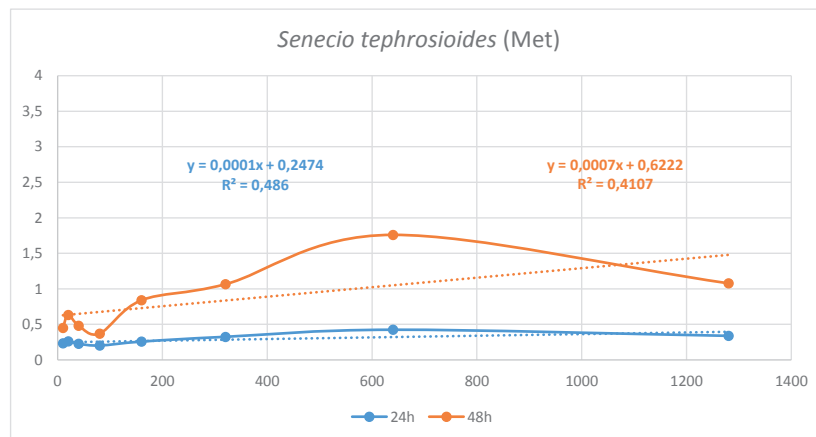


FIGURA 24. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO CLOROFÓRMICO VERSUS LA DENSIDAD ÓPTICA A 24 Y 48 HORAS DE INCUBACIÓN.

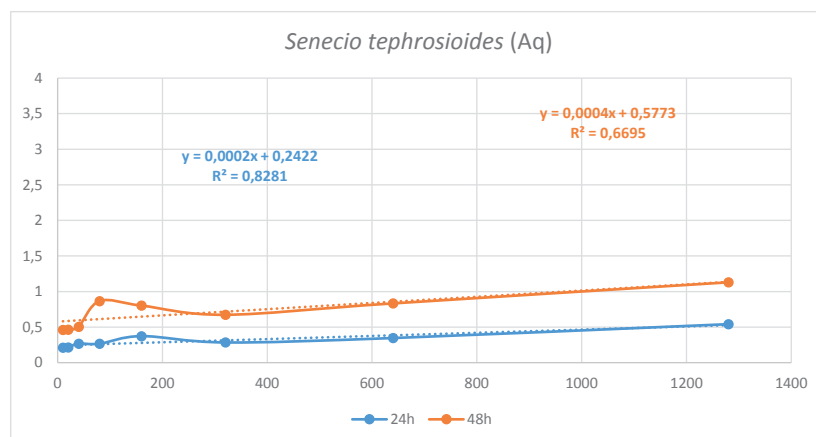


FIGURA 25. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO METANÓLICO VERSUS LA DENSIDAD ÓPTICA A 24 Y 48 HORAS DE INCUBACIÓN.

TABLA 10. VALORES DE DENSIDAD ÓPTICA (DO) (MEDIAS \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR) DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *EQUISETUM GIGANTEUM*.

| | H 24 h | H 48 h | Cl 24 h | Cl 48 h | Met 24 h | Met 48 h | Aq 24 h | Aq 48 h |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| PB | 0,202 \pm 0,01 | 0,439 \pm 0,011 | 0,199 \pm 0,009 | 0,439 \pm 0,012 | 0,215 \pm 0,018 | 0,432 \pm 0,015 | 0,215 \pm 0,018 | 0,433 \pm 0,016 |
| SFB | 0,236 \pm 0,012 | 0,56 \pm 0,042 | 0,236 \pm 0,012 | 0,56 \pm 0,042 | 0,29 \pm 0,04 | 0,675 \pm 0,14 | 0,29 \pm 0,04 | 0,675 \pm 0,14 |
| CP | | | | | 1,436 \pm 0,181 | 3,568 \pm 0,174 | | |
| 10 mg/ml | 0,191 \pm 0,005 | 0,428 \pm 0,011 | 0,192 \pm 0,031 | 0,417 \pm 0,055 | 0,241 \pm 0,064 | 0,424 \pm 0,006 | 0,212 \pm 0,016 | 0,405 \pm 0,012 |
| 20 mg/ml | 0,198 \pm 0,014 | 0,432 \pm 0,021 | 0,183 \pm 0,007 | 0,384 \pm 0,010 | 0,242 \pm 0,033 | 0,434 \pm 0,013 | 0,222 \pm 0,017 | 0,413 \pm 0,015 |
| 40 mg/ml | 0,188 \pm 0,004 | 0,42 \pm 0,006 | 0,231 \pm 0,027 | 0,465 \pm 0,014 | 0,207 \pm 0,008 | 0,421 \pm 0,01 | 0,216 \pm 0,014 | 0,422 \pm 0,011 |
| 80 mg/ml | 0,2 \pm 0,007 | 0,434 \pm 0,015 | 0,261 \pm 0,013 | 0,478 \pm 0,012 | 0,242 \pm 0,023 | 0,477 \pm 0,015 | 0,223 \pm 0,018 | 0,427 \pm 0,024 |
| 160 mg/ml | 0,19 \pm 0,008 | 0,418 \pm 0,007 | 0,321 \pm 0,029 | 0,530 \pm 0,038 | 0,235 \pm 0,016 | 0,545 \pm 0,048 | 0,226 \pm 0,091 | 0,609 \pm 0,127 |
| 320 mg/ml | 0,221 \pm 0,005 | 0,434 \pm 0,012 | 0,434 \pm 0,071 | 0,637 \pm 0,082 | 0,325 \pm 0,018 | 0,748 \pm 0,019 | 0,253 \pm 0,018 | 0,554 \pm 0,013 |
| 640 mg/ml | 0,225 \pm 0,024 | 2,778 \pm 0,648 | 0,557 \pm 0,002 | 0,751 \pm 0,009 | 0,366 \pm 0,034 | 0,943 \pm 0,032 | 0,278 \pm 0,029 | 0,673 \pm 0,005 |
| 1280 mg/ml | 0,248 \pm 0,018 | 0,442 \pm 0,012 | 0,863 \pm 0,054 | 1,058 \pm 0,053 | 0,51 \pm 0,064 | 1,445 \pm 0,173 | 0,376 \pm 0,085 | 3,525 \pm 0,107 |

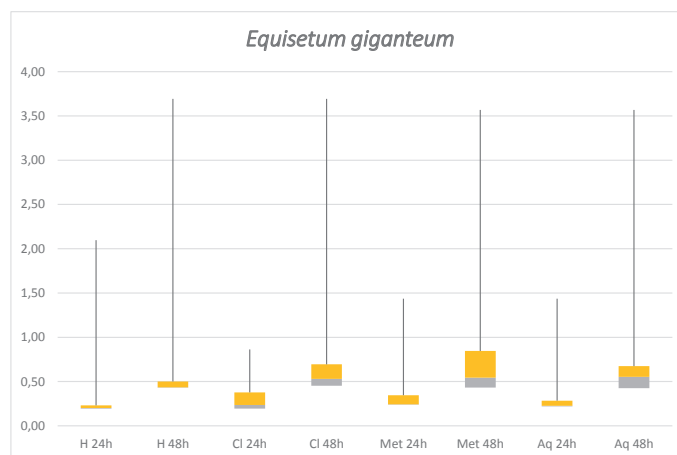


FIGURA 27. BOX-PLOT DE LOS DIVERSOS EXTRACTOS DE *E. GIGANTEUM*.

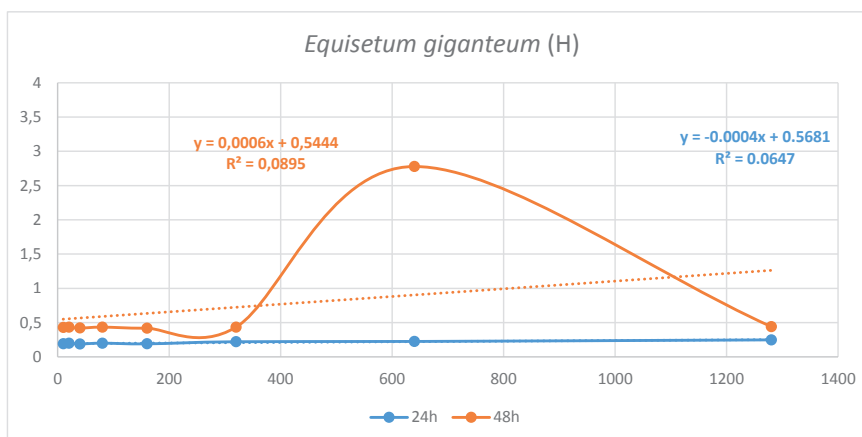


FIGURA 28. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO HEXÁNICO VERSUS LA DENSIDAD ÓPTICA A 24 Y 48 HORAS DE INCUBACIÓN.

Interferencia de pigmentos vegetales al aplicar la técnica XTT a extractos de *Buddleja globosa*, *Senecio tephrosioides* Turcz. Y *Equisetum giganteum*

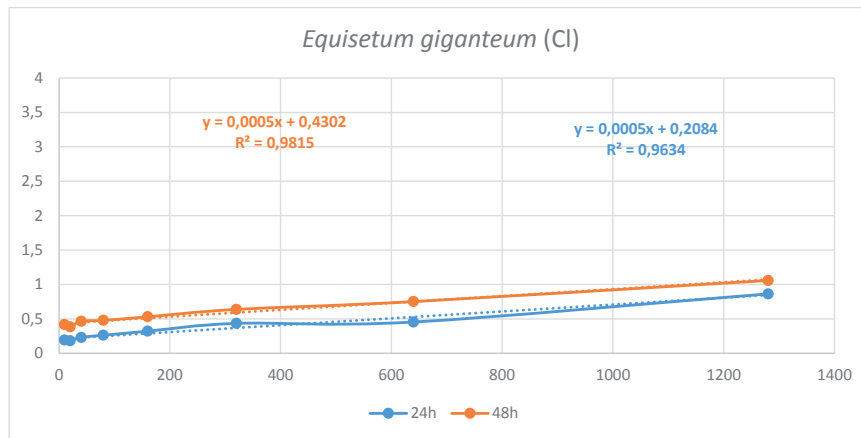


FIGURA 29. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO CLOROFÓRMICO VERSUS LA DENSIDAD ÓPTICA A 24 Y 48 HORAS DE INCUBACIÓN.

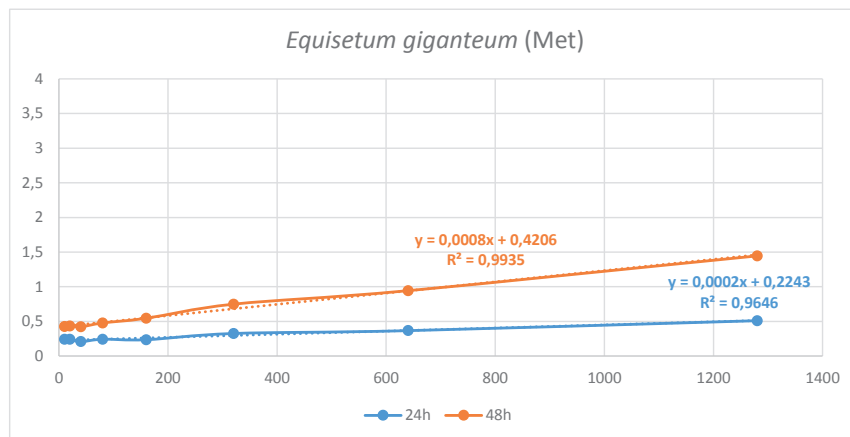


FIGURA 30. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO METANÓLICO VERSUS LA DENSIDAD ÓPTICA A 24 Y 48 HORAS DE INCUBACIÓN.

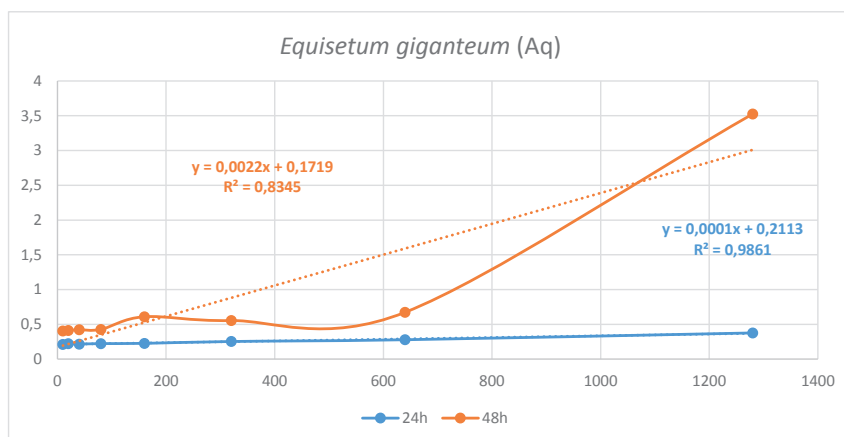


FIGURA 31. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ACUOSO VERSUS LA DENSIDAD ÓPTICA A 24 Y 48 HORAS DE INCUBACIÓN.