
Comparación de diferentes extractos, su dosis letal 50 en Artemia salina y la composición química del Granjel (*Celtis pallida* Torr.)

Comparison of different extracts, their lethal dose 50 in brine Shrimp and the chemical composition of Granjel (*Celtis pallida* Torr.)

Torres López Telma Gricelda, Magaña Magaña José Eduardo, Licón Trillo Lorena Patricia, Alonso Gómez Martín Armando

Universidad Autónoma de Chihuahua-Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales. Km 2.5 Carretera Delicias-Rosales, Campus Delicias, ciudad Delicias, Chihuahua., México. C.P. 33000

NOTAS SOBRE AUTORES

Torres López Telma Gricelda: griseldatorres.l@hotmail.com,  <http://orcid.org/0000-0003-46982825>

Magaña Magaña José Eduardo: jmagana@uach.mx

Licón Trillo Lorena Patricia: llicon@uach.mx,  <http://orcid.org/0000-0001-5586-4488>

Alonso Gómez Martín Armando: malonso@uach.mx,  <http://orcid.org/0000-0002-3828-0349>

Esta investigación fue financiada con recursos de los autores.

Los autores no tienen ningún conflicto de interés al haber hecho esta investigación.

Remita cualquier duda sobre este artículo a Telma Gricelda Torres López.

RESUMEN

Actualmente las plantas se consideran como una alternativa para la fitoterapia y la medicina tradicional debido al costo elevado de los tratamientos alopáticos. La búsqueda de nuevos medicamentos se ha efectuado en una amplia diversidad de plantas, experimentando un crecimiento importante en su uso con fines curativos y preventivos e incluso, asociadas con otros fármacos.

En esta investigación se trabajó con la raíz y el fruto del Granjel (*Celtis pallida* Torr.), se trituraron y se utilizaron en métodos de extracción Soxhlet, con solventes diferentes. También se realizaron extracciones por ultrasonido para encontrar metabolitos secundarios que puedan presentar actividad biológica. Se determinó la composición de ácidos grasos

Recibido: 27/03/2022

Aceptado: 03/06/2022

Publicado: 30/06/2022



Copyright © 2022 Torres López Telma Gricelda, Magaña Magaña José Eduardo, Licón Trillo Lorena Patricia y Alonso Gómez Martín Armando. Esta obra está protegida por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

mediante análisis cromatográfico por parte del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) subsección Delicias. Se efectuó un bioensayo de toxicidad sobre *Artemia salina*, herramienta útil para la determinación preliminar de toxicidad de extractos de plantas y su cuantificación de la concentración letal media (DL50).

Con base en los resultados obtenidos se observa que los extractos de fruto y raíz con disolventes de éter y cloroformo presentan una consistencia plastificante y que los solventes polares presentan mayor porcentaje de extracción que los menos polares. En el extracto de fruto medio, obtenido por ultrasonido, resaltó la mayor cantidad de polifenoles. Se determinó la presencia de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en el análisis cromatográfico. Se concluye que el extracto de fruto + metanol obtuvo menor toxicidad con una DL50 de 217.8, clasificándose como moderadamente tóxico.

Palabras clave: Plantas, toxicidad, polifenoles, ácidos grasos.

ABSTRACT

Currently, plants are considered as an alternative for phytotherapy and traditional medicine due to the high cost of allopathic treatments. The search for new medicines has been carried out in a wide diversity of plants, experiencing an important growth in their use for curative and preventive purposes and even associated with other drugs.

In this research, the root and fruit of Granjel (*Celtis pallida* Torr.) were crushed and used in Soxhlet extraction methods, with different solvents. Ultrasound extractions were also performed to find secondary metabolites that may present biological activity. The fatty acid composition was determined by chromatographic analysis by the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Delicias branch. A toxicity bioassay was performed on brine Shrimp, a useful tool for the preliminary determination of toxicity of plant extracts and its quantification of the mean lethal concentration (LD50).

Based on the results obtained, it is observed that the fruit and root extracts with ether and chloroform solvents present a plasticizing consistency and that the polar solvents present a higher extraction percentage than the less polar ones. The medium fruit extract, obtained by ultrasound, showed the highest amount of polyphenols. The presence of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids was determined in the chromatographic analysis. It is concluded that the fruit extract + methanol obtained lower toxicity with a LD50 of 217.8, being classified as moderately toxic.

Keywords: Plants, toxicity, polyphenols, fatty acids.

INTRODUCCIÓN

La práctica de la medicina herbolaria se basa en el uso terapéutico de las plantas medicinales, como sustituto de las medicinas farmacéuticas o en combinación. Existen diferentes formas de preparación de extractos para mejora de la salud utilizando tallos, hojas, fruto y raíces de las plantas. White (2002).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los medicamentos derivados de las plantas incluyen material, preparaciones y productos, que contienen como principios activos partes de plantas, u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos elementos y su uso está bien establecido y ampliamente reconocido como eficaz e inofensivo (OMS, 2016a). Datos de la OMS confirman que en México la cantidad de plantas usadas por sus propiedades curativas, de las cuales se tiene registro, asciende a cuatro mil especies; sin embargo, se estima que sólo 5 % han sido estudiadas para validar química, farmacológica y biomédicamente los compuestos químicos en los que reside su utilidad médica (OMS, 2016b).

Los autores Magaña., *et al.* (1999); Guedea., y Sánchez (2019), destacan que algunos habitantes de Delicias, Chihuahua, han utilizado una planta llamada Granjel, a la cual refieren que tiene una acción de control para la diabetes. Por ende, se emplea dicha especie nativa del desierto para la realización de este trabajo cuyo objetivo fue comparar diferentes extractos, la dosis letal 50 en *Artemia salina* y la composición química del Granjel (*Celtis pallida* Torr.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del material vegetal

Para la obtención de los extractos se utilizó raíz y fruto de Granjel de las localidades de Naica y Tierra Azul situadas en el estado de Chihuahua. La recolección de la materia vegetal se realizó en los meses de junio a julio de 2021 y se trasladó al laboratorio de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua donde se lavó con agua destilada y se secó extendida en una mesa a temperatura ambiente por 5 horas, hasta eliminar toda la humedad. Posteriormente, ya triturado el fruto en un mortero y reducida la raíz a un tamaño de un centímetro utilizando unas tijeras convencionales, se guardaron las porciones en un refrigerador convencional a una temperatura de 0 ° C, para su uso posterior.

Extracción sólido-líquido- Soxhlet.

Para precisar el porcentaje de grasa presente en el Granjel se utilizó el método de Franz von Soxhlet. Se realizaron ocho extracciones sólido-líquido del fruto fresco y de la raíz del Granjel

en equipo Soxhlet, los solventes utilizados fueron: cloroformo, acetona, éter y metanol, la extracción duró entre 3 y 4 horas hasta completar 6 sifonadas con 300 ml de disolvente. En todos los casos se determinó el porcentaje de grasas obtenido en cada extracto.

El rendimiento se calculó en porcentaje con la fórmula: % Grasas = $\frac{\text{Peso final} - \text{Balón vacío}}{G^m} * 100$

Extracción por ultrasonido sólido-líquido

La extracción asistida por ultrasonido es una opción segura, económica y de manejo sencillo (Soria & Villamiel 2010; Vieira et. al 2013). Para esta extracción se hizo una combinación de solventes con acetona, metanol y agua acidificada (15:35:50). Se utilizó raíz, fruto fresco, fruto medio y fruto oxidado del Granjel (*Celtis pallida* Torr.). La extracción se realizó por 30 minutos en ultrasonido Branson modelo 5800 que contenía agua con hielo, se sacaron las muestras y se filtraron de inmediato a través de papel filtro. No se usó baño maría. Obtenidos los extractos se guardaron en viales eppendorf envueltos en papel aluminio dentro del refrigerador convencional, hasta su uso posterior.

Polifenoles totales

Para la determinación de compuestos fenólicos se usó el método Folin-Ciocalteu, el cual es una técnica colorimétrica y cuantitativa que utiliza la naturaleza reductora de estos compuestos. Para su cuantificación se elaboró una disolución con ácido gálico ($C_6H_2(OH)_3COOH$) de 100 mg aforados a 100 ml con agua acidificada. En otros tubos de ensayo se diluyó 1 ml de cada extracto obtenido por ultrasonido (fruto fresco, fruto medio, fruto oxidado y raíz) en 9 ml de agua destilada, colocados en viales grandes para su correcta agitación, los extractos se diluyeron a 10 ppm debido a su fuerte concentración. Se elaboraron los estándares de 100, 200, 300, 400 y 500 ppm para la curva de calibración. Se midieron las absorbancias de las muestras de extracto en espectrofotómetro a una longitud de ondas de 755 nanómetros. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico por L de extracto (mgAG/LE).

Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases

El análisis de ácidos grasos fue realizado mediante el servicio del Centro de Investigación en alimentación y desarrollo, lugar a donde se llevaron las muestras obtenidas por extracción en Soxhlet.

Cuantificación DL50 de Artemia salina

Para delimitar el grado de concentración letal se usaron nauplios de Artemia de 48 horas de eclosionados, esto se realizó en un recipiente de cristal con 1000 ml de solución salina al 3% de cloruro de sodio (NaCl) y burbujeo de una bomba de oxígeno, se le agregó 2 gr de quistes de Artemia y se colocó en un espacio obscuro con una pequeña entrada de luz a una temperatura de 30 a 35 grados centígrados. Una vez eclosionados los nauplios se colocó una lámpara de luz fuerte a un lado del recipiente para atraerlos y se fueron colocando con ayuda de una pipeta de Pasteur 10 de ellos en viales de forma triple los cuales contenían solución salina (complementada con 1ml de levadura al 1%) y a diferentes concentraciones de extracto: 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 10 y

1 $\mu\text{g/mL}$, previamente disueltos en 1 ml de dimetilsulfóxido aforados a 100 ml de solución salina. Cada extracto se ensayó 3 veces. Se contabilizó el número de muertos y se precisó el porcentaje de mortalidad.

Ponderación de DL50

La ponderación de DL50 se hizo a través del método Probit que es un modelo econométrico no lineal que se utiliza para examinar la relación entre una variable de respuesta binaria y una variable de concentración continua. La ecuación Probit se calculó en Excel.

RESULTADOS

En las muestras de fruto y de raíz donde se utilizó éter al igual que en las muestras de fruto y raíz donde se usó cloroformo como disolvente, el extracto quedó de una consistencia pegajosa, la pigmentación fue diferente en cada uno de ellos. En cuanto a los disolventes de más polaridad

(acetona y metanol), las muestras se observaron con una consistencia manejable y una pigmentación de color naranja fuerte en los extractos del fruto, una hiperpigmentación café oscuro en el extracto de raíz con éter, raíz con cloroformo y raíz con acetona, en cambio, la pigmentación fue café claro en raíz con metanol. Es probable que las pigmentaciones fuertes posean mayor cantidad de compuestos. Se percibe que el solvente con mayor porcentaje de extracción de grasa en el fruto de Granjel es el metanol con una estimación de 47.12491111. Considerando que, el metanol extrae compuestos polares de forma específica se piensa que el extracto obtenido posee un alto contenido de dichos compuestos. En los extractos obtenidos mediante ultrasonido se observa la pigmentación más fuerte en el fruto medio, seguido por el fruto oxidado y luego el fresco. La raíz tuvo una coloración clara. Para la determinación del contenido de polifenoles totales se midió la absorbancia de la solución de

ácido gálico (patrón), y se elaboró la curva patrón correspondiente. Cabe mencionar que se hizo una sola repetición para polifenoles totales por lo cual no se saca desviación estándar.

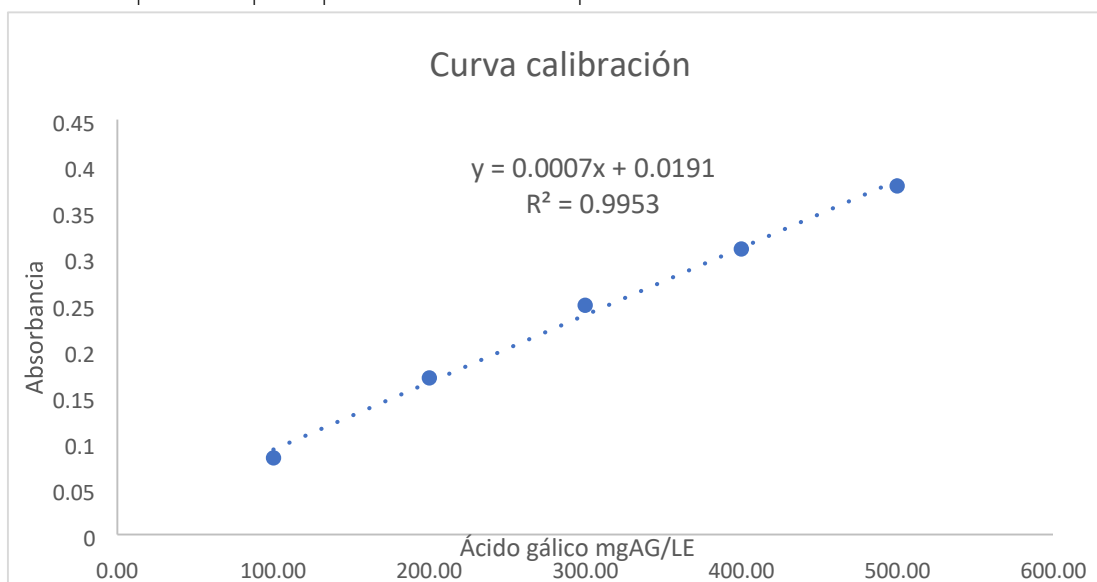


Figura 1. Curva de calibración del ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Tabla 1. Contenido de fenoles totales en los frutos y raíz del Granjel (*Celtis pallida* Torr.).

Extractos de <i>Celtis pallida</i> Torr.	Fenoles totales	MgAG/l E
Fruto fresco	927	mg/l
Fruto medio	6216	mg/l
Fruto oxidado	4509	mg/l
Raíz	3464	mg/l

El extracto del fruto medio presentó mayor cantidad de fenoles totales (62,160 mg/L), seguido por el fruto oxidado con 45, 090 mg/L, en tercer lugar, la raíz con (34, 640 mg/L) y 9, 270 mg/L de fruto fresco. Lo anterior, debido a que los extractos se diluyeron a 10 ppm en esta práctica.

El contenido de ácidos grasos que se obtuvo es el siguiente:

Extracto 2: Fruto + cloroformo		Extracto 1: Fruto + éter		Extracto 3: Fruto + metanol	
Ácido graso	Contenido (%)	Ácido graso	Contenido (%)	Ácido graso	Contenido (%)
C8:0	1.12	C8:0	2.49	C8:0	2.49
C12:0	0.99	C10:0	1.22	C12:0	1.22
C14:0	1.12	C12:0	2.4	C16:0	2.4
C16:0	24.67	C13:0	7.01	C18:2	7.01
C16:1	1.39	C14:0	1.74	C18:3	1.74
C18:0	1.43	C16:0	2.47	C22:0	2.47
C18:1	15.96	C16:1	1.98		
C18:2	4.69	C18:0	2.63		
C18:3	2.65	C22:0	78.05		
C20:0	39.05				

Extracto 4: Fruto + acetona		Extracto 5: Raíz + metanol		Extracto 6: Raíz + acetona	
Ácido graso	Contenido (%)	Ácido graso	Contenido (%)	Ácido graso	Contenido (%)
C8:0	1.19	C8:0	1.25	C14:0	57.41
C12:0	0.86	C12:0	0.99	C16:0	7.4
C14:0	1.51	C16:0	3.02	C18:1	6.68
C16:0	16.67	C22:0	94.73	C18:2	9.54
C18:1	10.76			C18:3	2.67
C18:2	12.3			C22:0	13.92
C18:3	17.32				
C22:0	39.38				

Extracto 7: Raíz + cloroformo		Extracto 8: Raíz + éter	
Ácido graso	Contenido (%)	Ácido graso	Contenido (%)
C8:0	0.24	C8:0	27.15
C12:0	0.24	C22:0	72.85
C14:0	0.43		
C16:0	9.87		
C18:0	1.38		
C18:1	8.61		
C18:2	15.72		
C18:3	4.04		
C20:0	50.58		
C22:0	8.69		

Cinco de los ocho extractos contienen un porcentaje más alto de ácido behénico (también conocido como ácido docosanoico) en relación con el volumen de grasa de los demás ácidos existentes en la raíz y fruto del Granjel, por lo que se deduce que es el principal componente del Granjel.

Para determinar los resultados experimentales del ensayo toxicológico DL50 de los extractos de *Celtis pallida* Torr. utilizando *Artemia salina*, se tomaron como referencia las recomendaciones del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), para clasificar las fracciones y patrones o blancos valorados según la toxicidad. El

experimento se consideró válido si el porcentaje de mortalidad en los controles (viales preparados y desarrollados en las mismas condiciones, pero en ausencia de extracto) no excedió de 10 % (Valdés *et al.*, 2009).

Tabla 2. Dosis letal media de los extractos de Granjel en los que se utilizaron diferentes solventes

EXTRACTO	DL50	CLASIFICACIÓN
Fruto + Cloroformo	10.4	Altamente tóxico
Fruto + Acetona	10.2	Altamente tóxico
Fruto + Éter	35.2	Altamente tóxico
Fruto + Metanol	217.8	Moderadamente tóxico
Raíz + Cloroformo	37.7	Altamente tóxico
Raíz + Acetona	1.2	Extremadamente tóxico
Raíz + Éter	23.1	Altamente tóxico
Raíz + Metanol	20.2	Altamente tóxico

Los resultados se obtuvieron con un análisis Probit el cual examina la relación entre 2 variables, una binaria y otra de tensión continua. El análisis se llevó a cabo aplicando una concentración de extracto a un número de *Artemia salina*, a las 24 horas de expuestas a la solución, se registró la cantidad de organismos muertos. De acuerdo con los datos de la muestra se realizó el cálculo Probit que predice la posibilidad de exista el 50% de mortalidad para cualquier estimación de la concentración en el campo experimental. El metanol, solvente que tiene más alta polaridad en relación con los otros 3 disolventes utilizados, tiene mayor valor de DL50 en la mezcla con fruto de Granjel por lo que presenta menos toxicidad, más no es así en el caso de la mezcla con raíz.

CONCLUSIONES

- Los 8 extractos realizados se compararon entre sí, se resalta que los extractos de fruto y raíz en los que se utilizó el disolvente de cloroformo, presentan una consistencia plastificante.
- El extracto de raíz + metanol presenta una consistencia acuosa y al momento de evaporar suelta una gran cantidad de espuma por lo que es posible la presencia de saponinas.
- El metanol es el disolvente que presentó mayor cantidad de extracto.
- A través del análisis fitoquímico se pudo apreciar la presencia de polifenoles y la existencia de ácidos grasos en el fruto y la raíz del Granjel.

- En los extractos realizados por ultrasonido se observó mayor cantidad de polifenoles en el extracto de fruto medio: 62,160 mg/L.
- El ácido behénico es el ácido graso de más alto porcentaje en los extractos del Granjel.
- El solvente de metanol con el fruto del Granjel presenta una DL50 mayor (217.8) en relación con los demás solventes, con lo que se clasifica: moderadamente tóxico.
- Los disolventes de acetona, cloroformo y éter de acuerdo a los resultados de su dosis letal media se clasifican extremadamente tóxicos de acuerdo a la tabla de CYTED.
- Se resalta que los valores obtenidos en la Dosis letal media no advierten una toxicidad como tal en humanos, más bien señalan toxicidad a nivel celular. Esto sirve para investigaciones futuras específicas que busquen nuevos productos naturales.

LITERATURA REVISADA

- Argolo, A., Pletsch, M., Coelho, L. Antioxidant Activity of Leaf Extracts from Bauhinia Monandra. Bioresour Technol 2004; 95: 229-233.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.12.014>
- Avello, L. M., & Cisternas, F. I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en
- Azuola, R. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). Chile. Revista médica de Chile, 138 (10). <https://doi.org/10.4067/S0034-98872010001100014>
- Braithwaite, A., Smith, F. J. (1999). Chromatographic methods. Kluwer Academic Publishers.
<https://doi.org/10.1007/978-94-011-0599-6>
- Branson (2014). Baños de ultrasonidos, modelos 1800, 2800, 3800, 5800, 8800.
- Cañigüeral, S., Dellacasa, E., & Bandoni, A. L. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? Acta farmacéutica bonaerense, 22, 14.
- Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM), *Celtis pallida* Torr., ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México. <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:10839>
- Gláucia S. Vieira Rodrigo N. Cavalcanti M. Angela A. Meireles Miriam D. Hubinger. (2013). Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*).
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.030>
- Gutiérrez, D., Ortiz, C., Mendoza, C. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para la alimentación animal. Simposio de Metrología. Santiago de Querétaro, México.

- White, L. B. (2002). El recetario herbario: las mejores alternativas naturales a los medicamentos.
- OMS (2016a). Medicina tradicional: definiciones. Recuperado el 9 de abril de 2016, a partir de: <http://www.who.int/topics/traditional/medicine/definitions/es/>
- OMS (2016b). Preguntas más frecuentes. <http://www.who.int/suggestions/faq/es/>
- Organización Mundial de la Salud & Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. (2020). Clasificación recomendada por la OMS de los plaguicidas por el peligro que presentan y directrices para la clasificación 2019. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/337246>. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Magaña *et al.*, 1999; Gueda y Sánchez, 2019. Percepción de la problemática ambiental en Delicias, Chihuahua, México. Sociedad y Ambiente. Volumen 24, pp. 1-32.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutrición Hospitalaria, 27(1), 76-89. <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci-arttext&pid=S0212-16112012000100009&lng=es&tlng=es>
- Rodríguez, W. (2019). Estudio comparativo de la composición de ácidos grasos del aceite de semillas de plantas de la Amazonia colombiana.
- Svetaz, L., Zulian, F., Derita, M., Petenatti, E., Tamayo, G., Cáceres, A., Cechinel-Filho, V., Giménez, A., Pinzón, R., Zacchino, A. S., Gupta, M. (2010). Value of the ethnomedical information for the Discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. Journal of Ethnopharmacology. 127: 137-158. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.034>
- Valdés, A., Martínez, J., Fidalgo, L., Parra, M., Ramos, I., Rodríguez, D., & Lizama, R. S. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de Artemia salina L. 3,5.
- Zuloaga, F., Belgrano, M., & Zanotti, C. (2019). Actualización del Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. Darwiniana, Nueva Serie, 7(2), 208-278. <https://doi.org/10.14522/darwiniana.2019.72.861>

Copyright © 2022 Torres López Telma Gricelda, Magaña Magaña José Eduardo, Licón Trillo Lorena Patricia y Alonso Gómez Martín Armando.



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia](#) - [Texto completo de la licencia](#)