

UNIVERSIDAD PRIVADA AUTÓNOMA DEL SUR

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL
DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**“DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DEL
EXTRACTO ACUOSO DE *Moringa oleifera* Lam. EN
POLIMORFONUCLEARES, AREQUIPA - 2020”**

PRESENTADA POR:

Bach. HUISA PARILLO MIRIAN RUTH

Bach. HUAYHUA SALVADOR GLADYS SOLEDAD

ASESOR:

Dra. Gisele María Delgado Montoya

AREQUIPA - PERÚ

2021

UNIVERSIDAD PRIVADA AUTÓNOMA DEL SUR

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DEL
EXTRACTO ACUOSO DE *Moringa oleifera* Lam. EN
POLIMORFONUCLEARES, AREQUIPA - 2020”**

PRESENTADA POR:

Bach. HUISA PARILLO MIRIAN RUTH

Bach. HUAYHUA SALVADOR GLADYS SOLEDAD

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL
DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**

APROBADO POR:

PRESIDENTE DEL JURADO: Dra. Romina Leslie Rondón Chambi

SECRETARIO DEL JURADO: Mg. Elvis Gilmar Gonzales Condori

VOCAL DEL JURADO: Mg. Betty Marilia Salazar Pinto

DEDICATORIA

A nuestro creador por guiar mis pasos en el logro de mis metas y proyectos. A los seres más importantes de mi vida: mis padres, mi familia por ser mi fortaleza y empuje para hacer realidad este proyecto, por su comprensión e infinito amor.

Mirian Ruth Huisa Parillo

A Dios mi padre celestial quien me acompaña y protege de mí el que me levanta de los tropiezos y me da más valentía para seguir continuando en la vida a quien le pido con mucha fe me ayude cumplir mis metas y a quien agradezco infinitamente por darme la familia que tengo.

A mis padres por haberme inculcado valores y brindarme una carrera profesional por sus motivaciones y consejos constantes para así lograr mis objetivos, los amo mucho gracias por todo su apoyo incondicional.

A mi esposo e hijo quienes son mi motor y motivo quienes me brindaron su apoyo y fortaleza para poder culminar mi carrera quienes me enseñan a ser mejor persona y querer superarme cada día más como profesional.

A mis hermanas por apoyarme emocionalmente dándome siempre ánimos puesto que nunca dejaron de creer en mí.

AGRADECIMIENTO

A Dios, quien guía y bendice nuestros planes y proyectos.

A nuestra casa de estudios, la Universidad Privada Autónoma del Sur, por la formación académica brindada en los cinco años de estudio.

A la Dra. Gisele María Delgado Montoya por su asesoramiento en la ejecución de la investigación.

A la plana docente de la Facultad de Ciencias Farmacia y Bioquímica, por brindar sus conocimientos durante los cinco años académicos.

Al personal del Laboratorio de especialidad de la Universidad Privada Autónoma del Sur por su predisposición durante la ejecución del proyecto.

Mirian Ruth Huisa Parillo

RESUMEN

La *Moringa oleifera* es considerada una planta muy importante en la medicina natural ya que es llamada “el árbol de la vida” por sus efectos antioxidante, antiinflamatorio, analgésico, antidiabético, vasodilatador, anticolinérgico, antirreumático y cicatrizante, etc., y es por ello que se ha encontrado un uso indiscriminado en su consumo, sin considerar el consumo correcto. Por tal motivo el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal evaluar el efecto citotóxico del extracto acuoso de *Moringa oleifera* sobre polimorfonucleares después de una exposición por 30 minutos, para lo cual se obtuvo el extracto acuoso de dicha planta llevando posteriormente a sequedad en estufa, a partir de este, se prepararon las diferentes concentraciones al 2%, 3%,5% y un control con buffer fosfato salino (PBS) para poder determinar el efecto citotóxico de cada concentración mediante los indicadores de viabilidad y funcionalidad consiguiendo así saber la cantidad de células vivas y/o muertas como también su índice fagocítico y no fagocítico de polimorfonuclear.

Como resultado en la concentración del 5% se obtuvo un 66.25% de viabilidad, mientras que en los extractos del 2 y 3 % la viabilidad está por encima del 81% siendo este un índice de viabilidad estadísticamente aceptable. Según el método de Tukey, se demostró que existía una diferencia significativa entre grupos de tratamientos del 5%, 2%, 3% y el grupo control.

En cuanto a la evaluación por funcionalidad (eficiencia fagocítica) el 3% y 5% son diferentes significativamente con el 2 % y no tiene diferencia significativa con el control, por otro lado, según a su eficiencia fagocítica es 73%, está por debajo del promedio aceptable. En conclusión, la concentración adecuada del extracto acuoso de *Moringa oleifera* para su consumo en forma segura es al 2%.ya sea por viabilidad y por funcionalidad.

Palabras Claves: *Moringa oleifera*, Índice de viabilidad, Eficiencia fagocítica.

ABSTRACT

Moringa oleifera is considered a very important plant in natural medicine since it is called "the tree of life" for its antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, antidiabetic, vasodilator, anticholinergic, antirheumatic and healing effects, etc., and that is why that an indiscriminate use has been found in its consumption, without considering the correct consumption. For this reason, the main objective of the present research work was to evaluate the cytotoxic effect of the aqueous extract of *Moringa oleifera* on polymorphonuclear cells after exposure for 30 minutes, for which the aqueous extract of said plant was obtained, subsequently leading to drying in the oven, From this, the different concentrations at 2%, 3%, 5% and a control with phosphate buffer saline (PBS) were prepared in order to determine the cytotoxic effect of each concentration using the indicators of viability and functionality, thus getting to know the amount of living and / or dead cells as well as their phagocytic and non-phagocytic polymorphonuclear index.

As a result, at the 5% concentration, a 66.25% viability was obtained, while in the 2 and 3% extracts viability is above 84%, this being a statistically acceptable viability index. According to the Tukey method, it was shown that there was a significant difference between treatment groups of 5%, 2%, 3% and the control group.

Regarding the evaluation by functionality (phagocytic efficiency), 3% and 5% are significantly different with 2% and it has no significant difference with the control, on the other hand, according to its phagocytic efficiency it is 73%, it is below the acceptable average. In conclusion, the adequate concentration of the aqueous extract of *Moringa oleifera* for safe consumption is 2%, both for viability and functionality.

Key Words: *Moringa oleifera*, Viability Index, Phagocytic Efficiency.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	1
AGRADECIMIENTO	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT.....	VII
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
INTRODUCCIÓN	XIII
CAPÍTULO I.....	1
EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema de Investigación:	1
1.2. Formulación del Problema	2
1.2.1. Problema Principal.....	2
1.2.2. Problemas Secundarios.....	2
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. Objetivo General.....	3
1.3.2. Objetivos Específicos	3
1.4. Justificación del estudio	4
CAPÍTULO II	5
MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes Investigación	5
2.1.1. A nivel Internacional	5
2.1.2. A nivel Nacional.....	7
2.1.3. A nivel Local	8
2.2. Base Teórica.....	10

2.2.1. <i>Moringa oleifera</i> Lam	10
2.2.2. Descripción Botánica	10
2.2.3. Ubicación taxonómica.....	12
2.2.4. Distribución geográfica	12
2.2.5. Composición química	13
2.2.6. Fitoquímica	13
2.2.7. Propiedades terapéuticas	14
2.2.8. Toxicidad de la <i>Moringa oleifera</i>	15
2.2.9. Citotoxicidad	16
2.2.10. Métodos para la determinación de la citotoxicidad.....	17
2.2.11. Fagocitosis	18
2.2.12. Polimorfonucleares	19
2.2.13. Levaduras.....	20
2.3. Hipótesis.....	20
2.3.1. Hipótesis Principal	20
2.3.2. Hipótesis Secundarias	20
2.4. Variables:.....	21
2.4.1. Identificación de Variables	21
2.4.2. Definición conceptual de variables.....	21
2.5. Operacionalización de Variables.....	22
CAPÍTULO III	23
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	23
3.1. Nivel, Tipo y Diseño de la Investigación:.....	23
3.1.1. Nivel de la Investigación	23
3.1.2. Tipo de Investigación	23
3.1.3. Diseño de la Investigación	24
3.2. Descripción de ámbito de la investigación	24
3.2.1. Ámbito de Estudio	24
3.2.2. Unidad de Estudio:	24
3.3. Población , muestra y muestreo.....	24
3.3.1. Población.....	24
3.3.2. Muestra	24
3.3.3. Muestreo	25

3.4. Técnicas e instrumentos de recojo de datos	25
3.4.1. Materiales, equipos y reactivos.....	25
3.5. Procedimiento.....	27
3.5.1. Preparación del Extracto Acuoso	27
3.5.2. Activación de la levadura	28
3.5.3. Obtención de polimorfonucleares	28
3.5.4. Grupo control.....	29
3.5.5. Exposición a <i>Moringa oleifera</i>	29
3.5.6. Prueba de viabilidad	29
3.5.7. Prueba de funcionalidad	30
3.6. Análisis estadístico	31
CAPÍTULO IV.....	33
RESULTADOS.....	33
4.1. Preparación del Extracto Acuoso	33
4.2. Activación de la levadura	33
4.3. Obtención de polimorfonucleares y exposición a <i>Moringa oleifera</i>	33
4.4. Prueba de viabilidad	35
4.4.1. Análisis estadístico de la viabilidad celular	36
4.5. Prueba de funcionalidad	40
4.5.1. Análisis estadístico de la funcionalidad celular	41
CAPÍTULO V.....	44
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	48
RECOMENDACIONES	49
BIBLIOGRAFÍA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ANEXO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de <i>Moringa oleifera</i>	12
Tabla 2. Operacionalización de Variables.....	22
Tabla 3. Distribución de Tratamientos y Controles para evaluar Viabilidad y Funcionalidad de los Polimorfonucleares después de su exposición al Extracto Acuoso de <i>M. oleifera</i>	34
Tabla 4. Porcentaje de Polimorfonucleares en la Prueba de Viabilidad Celular ...	35
Tabla 5. Descripción estadística del porcentaje de Viabilidad de Pmns de sangre venosa humana sometidos a extracto de <i>M. oleifera</i>	36
Tabla 6. Análisis de varianza (Anova) del porcentaje de Viabilidad de Pmns sometidos al Extracto de <i>M. oleifera</i>	38
Tabla 7. Comparación de medias de los porcentajes de Viabilidad de Pmns sometidos al Extracto de <i>M. oleifera</i> mediante la Prueba de Tukey	39
Tabla 8. Prueba de Funcionalidad de Polimorfonucleares frente al Extracto de <i>M. oleifera</i>	40
Tabla 9. Estadísticos descriptivos del porcentaje de Funcionalidad de Pmns de sangre venosa humana sometidos a Extracto de <i>M. oleifera</i>	41
Tabla 10. Análisis de varianza de los porcentajes de Funcionalidad de Pmns sometidos al Extracto de <i>M. oleifera</i>	42
Tabla 11. Comparación de medias de los porcentajes de Funcionalidad de Pmns sometidos al Extracto de <i>M. oleifera</i> mediante la Prueba de Tukey	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de la <i>Moringa oleifera</i>	11
Figura 2. Viabilidad celular por la técnica de azul Tripán.....	17
Figura 3. Proceso de fagocitosis	19
Figura 4. Mapa conceptual de procedimiento.	32
Figura 5. Índice de viabilidad.....	37
Figura 6. Eficiencia fagocítica.....	42

INTRODUCCIÓN

La medicina natural es de interés mundial e internacional, porque existen pruebas empíricas y científicas que avalan los beneficios de diversas plantas medicinales ya que son un recurso cuya parte o extractos se emplean como tratamiento de alguna afección, pero también, hay una gran preocupación sobre la inocuidad de las plantas utilizadas en la medicina natural pero de igual forma el ser humano las usa como recurso en sus tratamientos, esta controversia es de suma importancia por lo que obliga a la comunidad científica a investigar los posibles efectos adversos en su prolongación del consumo según las dosis (1).

La *Moringa oleifera* es una planta que crece en los continentes de África y Asia, y fue trasladada al Perú y crece en algunos valles peruanos debido al tipo de clima caluroso. Las hojas, raíces, flores y corteza poseen un alto efecto nutritivo y tienen propiedades medicinales, respecto a su composición, los principios activos más resaltante son moringinina y moringina, pero también posee ceras, resinas, ácido cafeoilquinico, etc. (1).

También se conoce la existencia de efectos tóxicos de la *Moringa oleifera*, dependiente de la dosis y tiempo de consumo. Entre los compuestos encontrados con efecto tóxico tenemos los alcaloides moringina, moringinina y spirochinen. En análisis fotoquímicos se encontró bencil isotiocianato, presente en la corteza y la raíz principalmente, pero la hoja es la parte de la planta más segura a consumir, entre los efectos tóxicos se describen, problemas hepáticos, alteraciones a nivel renal, efecto abortivos, entre otros (1).

El presente trabajo de investigación tiene como finalidad la evaluación de la citotoxicidad del extracto acuoso de *Moringa oleifera* para tener la certeza de que cuando se consuma debe considerarse si tiene un efecto inocuo o citotóxico, y así aportar medicina natural y seguridad para el consumo humano.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema de Investigación:

Desde tiempos antiguos el hombre ha hecho uso de las plantas con propósitos medicinales para tratar diferentes afecciones y hoy más que nunca en un intento de reemplazar los tratamientos terapéuticos (2).

Por otro lado, se observa el uso cada vez mayor de medicina natural en aquellos, especialmente, en países en vías de desarrollo por la poca accesibilidad a los tratamientos farmacológicos comparados con la de los países desarrollados, motivando a la comunidad científica a nuevas investigaciones sobre las plantas con fines terapéuticos (2).

En nuestro país encontramos una gran variedad de alternativas de plantas medicinales para diferentes afecciones; entre ellos, tenemos el árbol de la *Moringa* que es cultivado en el país desde el año 1999 en nuestro territorio (3).

Se ha reportado para esta planta efectos farmacológicos tales como: antiinflamatorio, debido que contiene alto contenido de fenoles y ácidos grasos en los extractos de sus raíces y semillas; vesicante, rubefaciente, antitumoral, antioxidante, hipoglucemiante anticancerígeno, antimicrobiano, antihipertensivo y coagulante (4).

Referente a la toxicidad, se ha evidenciado que la corteza del tallo contiene efectos abortivos provocando contracciones y muerte del feto. También se ha informado que dosis de 7mg/kg/día de la corteza del tallo, puede provocar anomalías hepáticas, alterando también la función renal (5).

Ensayos de toxicidad crónica y aguda en ratas demostraron que las semillas de moringa no presentan efectos tóxicos. Se han utilizado los extractos de semillas en terapias antioxidantes para reducir la genotoxicidad del arsénico u otros metales pesados debido a que los

aminoácidos metionina, cisteína, vitaminas, β -caroteno son responsables de la remediación del estrés oxidativo producido por el arsénico (6).

Por lo tanto, ya que el consumo de hojas de *Moringa* es el más consumido nos obligan a asegurar todos los parámetros que garanticen la calidad e inocuidad de la planta, dentro de los que se encuentran estudios citotóxicos.

1.2. Formulación del Problema

1.2.1. Problema Principal

- ¿Cuál será el efecto citotóxico del extracto acuoso de *Moringa oleifera* Lam sobre Polimorfonucleares sanguíneos humanos?

1.2.2. Problemas Secundarios

- ¿Cuál es el porcentaje de viabilidad y funcionalidad de PMNs sanguíneos humanos sometidos al extracto acuoso de *Moringa oleifera* al 2%?
- ¿Cuál es el porcentaje de viabilidad y funcionalidad de PMNs sanguíneos humanos sometidos al extracto acuoso de *Moringa oleifera* al 3%?
- ¿Cuál es el porcentaje de viabilidad y funcionalidad de PMNs sanguíneos humanos sometidos al extracto acuoso de *Moringa oleifera* al 5%?
- ¿Cuál es la diferencia entre el porcentaje de viabilidad y funcionalidad de polimorfonucleares sanguíneos humanos sometidos al extracto acuoso de *Moringa oleifera* al 2%, 3%, 5% con PMNs inmersos en PBS (control negativo) y con el índice de viabilidad y efectividad fagocítica respectivamente?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Determinar el efecto citotóxico del extracto acuoso de *Moringa oleifera* Lam. sobre polimorfonucleares sanguíneos humanos.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar el porcentaje de viabilidad y de funcionalidad de PMNs sanguíneos humanos sometidos al extracto acuoso de *Moringa oleifera* al 2%.
- Determinar el porcentaje de viabilidad y de funcionalidad de PMNs sanguíneos humanos sometidos al extracto acuoso de *Moringa oleifera* al 3%.
- Determinar el porcentaje de viabilidad y de funcionalidad de PMNs sanguíneos humanos sometidos al extracto acuoso de *Moringa oleifera* al 5%.
- Comparar el porcentaje de viabilidad y funcionalidad de polimorfonucleares sanguíneos humanos sometidos al extracto acuoso de *Moringa oleifera* al 2%, 3%, 5% con PMNs inmersos en PBS (control negativo) y con el índice de viabilidad y efectividad fagocítica respectivamente.

1.4. Justificación del estudio

Hoy en día, en el Perú se emplean las plantas medicinales tanto en zonas rurales como urbanas, ya que ha crecido el interés en terapias alternativas y el uso de productos naturales, por lo tanto son necesarios los estudios para comprobar su efectividad y establecer su toxicidad, especialmente frente al abuso y uso incorrecto de las plantas medicinales que dan como resultado los efectos secundarios y problemas de toxicidad (7).

Dentro de la variedad de plantas naturales que son utilizadas como tratamiento tenemos el género de la *Moringa oleifera*, sobre la cual se han realizado diversos estudios de sus hojas ya que actúan como buena fuente de antioxidantes naturales debido a la presencia de diversos tipos de compuestos antioxidantes (8) y sus propiedades medicinales en la muerte de células cancerosas de hígado y pulmón (9). Propiedades anticonvulsivas (10) y como ayuda en el tratamiento y la prevención de la desnutrición (11).

Pero existen referencias bibliográficas donde avalan que las semillas, raíz y corteza pueden ser tóxicas por contener alcaloides como la moringinina, spirochin, espiroquina (1) y su uso excesivo puede tener problemas secundarios como daño a nivel hepático y renal (12) o un efecto citotóxico.

Existen una amplia variedad de estudios científicos sobre los beneficios y usos de *Moringa oleifera*; y en el campo de investigación sobre sus posibles efectos adversos y citotoxicidad debería ser igualmente amplio. Lo cual esto permitiría tener la certeza de que su utilización es segura siendo pertinente, desarrollar más investigaciones sobre el otro lado de la planta.

Es por tal motivo, que resulta de gran interés el presente trabajo de investigación, en el que se determinó si el consumo de las hojas de *Moringa oleifera* ejerce un efecto citotóxico sobre las células eucariontes por lo que utilizamos un modelo con Polimorfonucleares.

Teniendo una importancia social ya que aportará información para el

estudio de seguridad de *M. oleifera* con respecto a sus concentraciones, la cual podrá ser de gran ayuda para el momento de establecer la dosis, brindando una gran aportación de estudio a la fitoterapia y medicina complementaria para así poder ser consumido por la población como tratamiento.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes Investigación

2.1.1. A nivel Internacional

Aymé Fernández-Calienes Valdés; I Judith Mendiola Martínez; Deyanira Acuña Rodríguez; Yamira Caballero Lorenzo, Ramón Scull Lizama, IV Yamilet Gutiérrez Gaiténiv.2012. Actividad Antimalárica Y Citotoxicidad De Extractos Hidroalcohólicos De Seis Especies De Plantas Usadas En La Medicina Tradicional Cubana. En este trabajo de investigación se evaluó extractos de 6 especies de plantas y determinar su selectividad midiendo la citotoxicidad frente a células humanas. se prepararon extractos hidroalcohólicos, evaluando la actividad antiplasmodial in vitro de *A. glabra*,

B. pilosa, *C. longa*, *C. peltata*, *H. crepitans*. Y *P. odorata* Cass, frente *Plasmodium calciparum* y fibroblastos humanos se utilizó una línea celular humana embrionica diploide de pulmón, para determinar el efecto citotóxico de los extractos de plantas. La concentración de extracto que causó 50 % de la toxicidad celular o concentración citotóxica media (CC₅₀) se calculó por interpolación lineal. El índice de selectividad (IS) se determinó como el cociente de los valores de la CC₅₀ y de la CI₅₀. En dicha investigación se puede concluir que se obtuvo una actividad potente actividad antimalarica del extracto hidroalcoholico de hojas *H. crepitans* (13).

Susana Nora García Franco .2003.” Citotoxicidad Y Genotoxicidad De Extractos De *Ancoche, Ilex Paraguaiensis*”. Universidad De Buenos Aires.

En este trabajo se evaluó la actividad citotóxica y genotoxicidad de forma aguda, repetida y crónica de los extractos de *Ancoche* y *Ilex paraguayensis*, la citotoxicidad se evaluó mediante ensayos de coloración (cristal violeta, rojo neutro), mediación de actividades enzimáticas y concentración de proteínas. De la comparación de los extractos se determinó que el matanólico resulta algo más tóxico que el acuoso en exposiciones agudas para *Ancoche* dado que a la misma concentración con mayores valores para ensayos que indica viabilidad celular y menores para los que indica el daño celular (14).

María Linda Mendoza Prillwitz Vivian Stephanie Oliva Flores.2016. Determinación de la Actividad Antioxidante y Actividad Citotóxica de Hoja y flor de *Cornutia Pyramidata* Y *Cornutia Grandifolia*. Universidad De San Carlos De Guatemala Facultad De Ciencias Químicas Y Farmacia.

Para evaluar la citotoxicidad, se realizaron las pruebas de *Artemia salina*, *Allium cepa* y linfoproliferación in vitro. Los dos extractos de *C. grandifolia* silvestre y los extractos de diclorometano de *C. pyramidata*, tanto silvestre como cultivada, mostraron una CL50 entre 0.50 y 0.68 mg/mL, clasificándose como ligeramente o moderadamente tóxicos. Todos los extractos evidenciaron actividad citotóxica y genotóxica para el ensayo de *A. cepa*, inhibiendo el crecimiento radicular en más del 65% y observándose muy pocas células en mitosis (15).

Magdalena Romero Jiménez. “Estudio Antigenotoxicológico y de Citotoxicidad De Plantas Medicinales De Uso Cotidiano Y De Sus Fenoles Más Característicos”.2013. Universidad De Córdoba-España- Departamento De Genética.

Todas las plantas y moléculas ensayadas han resultado tóxicas para *D. melanogaster*, aunque a distintas intensidades, que son en orden creciente: *V. officinalis*, *Ác. Valerénico*, *Bisabolol*, *Limoneno*, *Quercitina*, *DHBA*, *Mentol*, *T. cordata*, *Pulegona*, *M. chamomilla*, *Apigenina*, *U. tomentosa*, *M. pulegium*, y *M. piperita*. Destacamos en general, las plantas sedantes *Tila* y *Valeriana* así como sus componentes estudiados, los menos tóxicos y las

digestivas Mentas, las más tóxicas (16).

2.1.2. A nivel Nacional

Florencia Vergara Quispe; Carlos Quijano Jara. 2017. Efecto del extracto acuoso de *Moringa oleifera* sobre el índice mitótico y la frecuencia de micronucleos en *Allium cepa*. Laboratorio de Genética de Poblaciones. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.

En dicha investigación se estudió el extracto acuoso de *Moringa oleifera* sobre el índice mitótico y la frecuencia de micronucleos en *Allium cepa* utilizando su raíz en unas concentraciones a 0.05,0.1,0.5 y 1 g/l la cual se analizaron en un intervalo de tiempo de 48 horas y 72 horas, que se tuvo como resultado que a las 48 horas se evidencia el daño citotóxico con disminución del índice mitótico en toda la raíz expuesta del extracto en un tratamiento de 0g/ L. sin alterar la fase mitótica (17).

Ms. Santa Cruz López, Cinthya Yanina.2019. Efecto citotóxico y genotóxico del extracto acuoso de *Physalis peruviana* L. (aguaymanto) sobre células meristemáticas de *Allium cepa* (cebolla) y linfocitos humanos. Universidad Nacional de Trujillo. El presente estudio se evaluó el efecto citotóxica y genotóxico de extracto acuoso de *Physalis peruviana* L., en una concentración de 20 y 30mg/30 mg/ml sobre células meristemáticas de *Allium cepa* en concentraciones de 62,5, 100,250 y 1000 ug/ml, la cual se utilizó una coloración y montaje y lectura microscópica que evidenció el índice mitótico donde se observaron células binucleadas y puentes cromosómicos. Mientras que los linfocitos se obtuvieron de la sangre de tres donantes como controles positivo y negativo respectivamente, observando la disminución de la viabilidad de los linfocitos aumentando el daño celular, concluyendo que el aguaymanto

tiene efecto citotóxico sobre la cebolla en concentraciones de 10,20 y 30 mg/ml sobre los linfocitos humanos (18).

Aspajo Julca, Erick Lucio; Siguas Cisneros, Lesman. "Citotoxicidad In Vitro Del Extracto Hidroalcoholico De Corteza De *Maytenus Macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq Sobre *Artemia Franciscana*". Universidad Nacional De La Amazonia Peruana Facultad De Farmacia Y Bioquímica

En el presente trabajo de terminaron la actividad citotóxica in vitro de la corteza de *Maytenus macrocarpa* sobre la *Artemia franciscana* la misma que fue procedente de Loreto la citotoxicidad se determino fue a través del cálculo cl50 vía análisis Probit se concluyó que la corteza con Cl50=5,2857 ppm produce actividad biológica de citotoxicidad siendo altamente tóxica y la presencia de metabolitos secundarios ya sea alcaloides fenoles y saponinas tienen actividad citotóxica (19).

Edward Joao Sinti Ochavano Bach. Fiorella Delfina Torres Rojas.2017. "Citotoxicidad In Vitro Del Extracto Hidroalcohólico De Hojas Y Fruto Inmaduro De *Inga Edulis Mart.* Sobre *Artemia Franciscana*". Universidad Nacional de La Amozonia Peruana-Facultad De Farmacia Y Bioquímica.

En su metodología la solución etanol y agua los quistes de *Artemia franciscana* fueron eclosionados a nauplios como resultado final obtuvieron que el fruto inmaduro y hojas de *inga edulis mart* presentan citotoxicidad (20).

2.1.3. A nivel Local

Martínez Huamaní, Pierina Alexandra.2015. Determinación del Efecto Citotóxico Del Extracto Etanólico De Hojas De *Annona Muricata L.*

"Guanábana" Frente A La Línea Celular MCF-7 De Cáncer De Mama. Universidad Nacional De San Agustín Facultad De Ciencias Biológicas-Arequipa. En la presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto citotóxico de hojas de *annonna muricata* L.(guanábana)frente el cáncer de mama.las células monocleares extraídas de sangre periférica (células normales fueron expuestas en diferentes concentraciones la viabilidad celular se tuvo como resultado que el extracto etanolico de hojas de *Annona muricata* L. es citotóxico para la línea celular de cáncer de mama, la IC50 del extracto etanólico de hojas *Annona muricata* L., fue de 125.5 JQ/ml en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 Y 125.4 IJQ/ml para células normales la cual indica la selectividad obteniendo a partir de estos ,tiene un valor de 0.999,indicando que el extracto etanolico de *Annona muricata* L. no es selectivo. El extracto etanólico de hojas *A. muricata* L. mostro ser veinte veces más citotóxico que el fármaco quimioterapéutico (21).

Gonzales Urday, Analucia; Martínez Málaga, Jimena Alexandra. 2017. Efecto Del Inhibidor Mg132 Sobre El Sistema Ubiquitina Proteosoma, La Citotoxicidad, Agregación Proteica Y Los Niveles De Proteína Lrp1 En Células Hepg2. Universidad Católica De Santa María-Arequipa.

En la determinada investigación se demostró que Mg132, inhibidor del sistema ubiquitina-proteosoma, induce citotoxicidad, agregación de proteínas y reduce los niveles de la proteína LRP1 en células HepG2, estas células se trataron durante 24 horas con diferentes concentraciones reduciendo la viabilidad celular de una manera dependiente a la concentración (22).

Ronald Roy Fernandez Burgos.2017. "Extraccion De Compuestos Fenólicos de la Macroalga Marina (*Lessonia Trabeculata*), Determinación De Su Actividad Antioxidante Y Evaluación Citotóxica". Universidad Nacional De San Agustín De Arequipa Facultad De Ciencias Naturales Y Formales Escuela Profesional De Química.

En el presente trabajo tuvieron como resultado que los ensayos de citotoxicidad mostraron que el extracto polar de la Macroalga Marina

(*Lessonia trabeculata*), no registró actividad citotóxica frente a las líneas celulares de A549, HBL-100, Hela, SW1573, T-470, y WiDr (23).

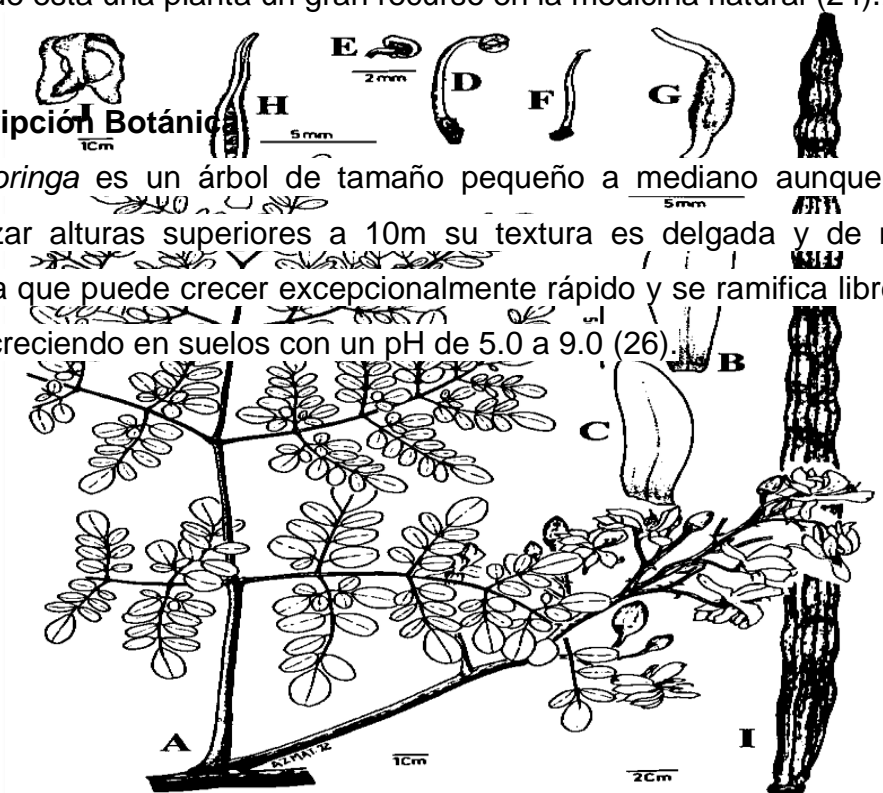
2.2. Base Teórica

2.2.1. *Moringa oleifera* Lam

Conocido como *Moringa* o *Ben*, es un árbol que crece en cualquier tipo de suelo y hasta en condiciones de elevada sequedad esta planta es originaria del norte de la India, que para los pobladores que habitan en estas zonas hace de esta una planta un gran recurso en la medicina natural (24).

2.2.2. Descripción Botánica

La *Moringa* es un árbol de tamaño pequeño a mediano aunque puede alcanzar alturas superiores a 10m su textura es delgada y de madera blanda que puede crecer excepcionalmente rápido y se ramifica libremente (25), creciendo en suelos con un pH de 5.0 a 9.0 (26).



A. rama; B. pétalo; C. sépalo; D. estambre fértil; E. anteras; F. estambre estéril; G. parte de fruto; H. ovario; I. fruto; J. semilla

Figura 1. Partes de la *Moringa oleifera* (27).

- a. **Tallo:** El árbol tiene un tallo corto y normalmente recto pero interiormente está mal formado. Antes de comenzar a ramificarse puede alcanzar a medir una altura de 1.5m a 2 m pero logrando eventualmente alcanzar los 3 m (25).
- b. **Rama:** Las ramas extendidas crecen de manera desorganizada y el dosel que está constituida por las capas de ramas tiene forma de paraguas (25).
- c. **Hojas:** Las hojas pinnadas alternas crecen principalmente en las puntas de las ramas y las hojas compuestas tripinnadas de entre 20 a 60 cm de longitud y son plumosas con folíolos elípticos de verde brillante a verde oscuro. El árbol en ocasiones es confundida con una leguminosa debido a sus hojas (25).
- d. **Flores:** Las flores son mayormente de color blanco a crema con puntos amarillos en la base, es llamativa y con aroma ligeramente fragante, miden unos 2 cm de diámetro con 5 pétalos y 5 sépalos reunidos en inflorescencia colgantes (25).
- e. **Frutas:** Las frutas son conocidas como vaina en forma de cápsulas trilobulares colgantes. Las vainas cuando están secas miden de 30-120 cm de largo, 1.8 cm de ancho, sus vainas inmaduras son de color verdes y de maduras marrones, la producción de frutas es en el mes de marzo y abril (25).
- f. **Semillas:** Las cáscaras de las semillas son generalmente de color marrón oscuro, las semillas son de forma redondas con un casco de semillas semipermeable de un color parduzco, tiene tres alas blancas que se

extienden de arriba a abajo. Son muy ricas en aceite y cada árbol puede producir entre 15,000 y 25,000 semillas al año (25).

2.2.3. Ubicación taxonómica

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Moringa oleifera*.

Taxonomía	
Reino:	Plantea
División	Magnoliophyta
Clase	Eudicotyledoneae
Orden	Brassicales
Familia	Moringaceae
Genero	Moringa
Especie	<i>M. oleifera</i> Lam 1783

Fuente. Mauricio Andres, Chepote Caverro *et al* (28).

2.2.4. Distribución geográfica

La *Moringa* tiene su origen en las tierras del suroeste de Arabia e India. Se encuentra ampliamente distribuido desde el sur de Asia hasta África occidental, Caribe, Florida y del Pacífico y Latinoamérica (México, Perú, Paraguay, Brasil, Puerto Rico, Venezuela), pero es más visible en partes del Este y Sudáfrica (29).

En el Perú crece en el distrito de Pátapo, a unos 35 kilómetros al Este de Chiclayo (Lambayeque), en Villacuri Ica, en Puyango Tumbes (30).

2.2.5. Composición química

Por su gran variedad de principios activos la *Moringa oleifera* llega a tener una importancia medicinal, nutricional y curativa tanto así; que la Organización de las Naciones Unidas (ONU) recomienda complementar la dieta con el consumo de esta planta ya que es rica en: (29)

- Ácidos grasos insaturados; como el ácido oleico, que se obtiene de las semillas que debido a su estabilidad y alto contenido es apto para freír. El ácido linoléico es el más abundante en las hojas; mientras que el palmítico predomina en el resto de la planta.
- Aminoácidos esenciales que se encuentra en los brotes; la *Moringa* contiene hasta 18 de los 20 aminoácidos esenciales para la salud.
- Aminoácidos no esenciales encontrados en las semillas.
- Minerales en los frutos y hojas como el Potasio, Calcio, Hierro, Magnesio, Zinc, siendo el potasio su elemento más abundante
- Vitaminas en las hojas y frutos, como son la Vitamina C, A, E y del complejo B)
- Proteínas en el fruto y en las semillas
- Fibra en los frutos, hojas y semillas
- Carbohidratos, carotenos y tocoferoles (31).

2.2.6. Fitoquímica

En las diferentes partes de la planta se encuentran metabolitos secundarios como los flavonoides entre estos tenemos al campferol, quercetina, mirecetina, isoramnetina, glucósidos de campferol, y rutinósidos importante para la salud cardiovascular y el sistema inmunitario por su alto valor antioxidante (8).

Ácido clorogénico; esta sustancia permite a la planta defenderse de las agresiones ambientales y actúa como antioxidante y antiinflamatorio.

Taninos, saponinas, polifenoles, malonilglucósidos, glucósidos fenólicos (niazirina y niazicina), glucósidos cardiacos, esteroles y glucoesteroles,

ácidos grasos y alcaloides,

También se han encontrado metabolitos minoritarios como son los glucosinolatos, isocianatos, dipéptidos y derivados de urea (31).

2.2.7. Propiedades terapéuticas

Desde el siglo XVIII a. C se han encontrado en distintos libros de la medicina ayurvédica registros sobre algunas propiedades terapéuticas de *Moringa oleifera*. Estudios realizados afirman que la raíz, hojas, tallos, resina, flores y semillas tienen usos medicinales (32).

- a. **Raíz:** tiene efecto antilitiásico, rubefaciente, vesicante, carminativo, para la fertilidad, antiinflamatorio, para estimular a pacientes en estado paralítico; también actúa como tónico cardiocirculatorio, como laxante, como método abortivo y se emplea para aliviar algunas afecciones: reumatismo, inflamaciones, dolores articulares, sacrolumbalgia y estreñimiento (32).
- b. **Hojas:** Pueden utilizarse como purgante, como cataplasma en las heridas, para minimizar los dolores de cabeza (frotarlas en la sien), la hemorroides, la fiebre, el dolor de garganta, la bronquitis, las infecciones óticas y oculares, el escorbuto y el catarro; el jugo de las hojas controla los niveles de glucosa y reduce la inflamación glandular (32).
- c. **Corteza del tallo:** Como rubefaciente, vesicante, para curar enfermedades oculares y para el tratamiento de pacientes delirantes. Asimismo, previene el agrandamiento del bazo y la formación de glándulas tuberculosas en el cuello, destruye los tumores y sana las úlceras. El jugo de la corteza del tallo alivia los dolores de oídos, se pone en la cavidad dentaria como analgésico y tiene actividad antituberculosa (32).
- d. **Goma o resina:** Se emplea para corregir las caries dentales, es astringente y rubefaciente; mezclada con el aceite de ajonjolí, alivia el dolor de cabeza, la fiebre, las molestias intestinales, la disentería y el asma. Muchas veces se utiliza como abortivo y para tratar a pacientes con sífilis y afecciones reumáticas (32).
- e. **Flores:** Poseen alto valor medicinal como estimulante, afrodisíaco,

abortivo, colagogo y antiinflamatorio. Se emplean para aliviar enfermedades musculares, histeria, tumores, agrandamiento del bazo, para bajar los valores del colesterol, los fosfolípidos y los triglicéridos; también disminuye el perfil lipídico del hígado, del corazón y de la aorta en conejos hipercolesterolémicos y aumenta la excreción de colesterol fecal (32).

- f. **Semillas:** El extracto de las semillas ejerce su efecto protector, disminuye los peróxidos lipídicos del hígado (32).

Y debido a sus múltiples propiedades bactericidas y floculantes, son aplicadas para la purificación del agua en poblaciones donde impera la deficiencia de servicios de salud y agua potable (33).

Otros usos medicinales, tales como: antiepiléptico, antipirético y antiespasmódico.

Por otra parte, actualmente en muchas regiones de África, la *Moringa* se usa para tratar a pacientes con diabetes mellitus, hipertensión arterial y virus de la inmunodeficiencia humana/sida (33).

2.2.8. Toxicidad de la *Moringa oleifera*

En estudios realizados se han encontrado evidencias de que la mayoría de plantas medicinales producen toxicidad a nivel celular, por presentar una alta concentración de sustancias como los alcaloides y los glúcidos cianogénicos (34).

Las investigaciones hechas para la *Moringa oleifera* demuestran que existe toxicidad en algunas de sus partes las que serían altamente tóxicas vendrían a ser la raíz, la corteza y las semillas debido a que contienen sustancias tóxicas como la moringina, moringinina, , espiroquina y el fotoquímico bencil- isotiocianato (alcaloides) que son dañinos para el organismo, mientras que posiblemente la parte más segura para el empleo medicinal y/o consumo vendría a ser las hojas (1).

Para el caso de:

- a. **La corteza;** tiene una acción rubefaciente y vesicante para lo cual se ha probado que en zonas delicadas como los ojos, la piel del rostro y la

tráquea cause úlceras y pápulas peligrosas ya que es utilizada con diversos fines terapéuticos y paliativos (35).

- b. El triturado de la corteza** contiene bencil isotiocianato y moringinina cuyo mecanismo de acción se relaciona al receptor de la hormona folículo estimulante (FSH) y esto explica sus propiedades anticonceptivas naturales, también contiene una sustancia abortiva que causa violentas contracciones uterinas capaces de inducir la muerte del feto (35).
- c. La raíz;** contiene un alcaloide llamado espiroquina que puede ser un potencial tóxico si su consumo es en grandes cantidades provocando daños en la función renal, alteraciones en el SNC y parálisis del nervio vago causando taquicardia y paro cardiorrespiratorio (35).
- d. La semilla;** tiene efectos tóxicos por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa y también por los constituyentes antimicrobianos (35).
- e. Las hojas,** contienen fitatos de 3.1% que puede ser perjudicial para aquellas personas vegetarianas, ya que su alto consumo reduce la biodisponibilidad de metales divalentes y trivalentes como Ca, Fe, Zn y Mg. Pero pese a esto las hojas de *Moringa oleifera* son la parte anatómica de la planta cuyo consumo representa menor riesgo para la salud (35).

Mientras que algunos autores encontraron que la moringa puede ocasionar daño hepático y renal, (12) citotoxicidad (36) y genotoxicidad (37).

2.2.9. Citotoxicidad

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 (38).

La viabilidad celular, la proliferación celular y muchas funciones importantes de las células vivas, incluidas la apoptosis, la adhesión celular, la quimiotaxis, la resistencia a múltiples fármacos, la endocitosis, la secreción y la transducción de señales, pueden estimularse o controlarse con diversos reactivos químicos y biológicos. Muchos de estos procesos conducen a cambios en los radicales intracelulares, concentraciones de

iones libres o potencial de membrana que puede seguirse con indicadores fluorescentes que respondan adecuadamente (39).

La medición de la viabilidad celular juega un papel fundamental en todas las formas de cultivo celular. A veces es el objetivo principal del experimento, como en los ensayos de toxicidad (40).

2.2.10. Métodos para la determinación de la citotoxicidad

a. Determinación de Viabilidad por Azul de Tripán

La medición de la viabilidad celular juega un papel fundamental en todas las formas de cultivo celular, siendo el objetivo principal del experimento, como en los ensayos de toxicidad.

La prueba de exclusión de colorante se usa para determinar las células visibles presentes en una suspensión celular. Se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen ciertos colorantes, como el azul de Tripán, la eosina o el propidio, mientras que las células muertas no. En esta prueba, una suspensión celular simplemente se mezcla con tinte y luego se examina visualmente para determinar si las células absorben o excluyen el tinte. Una célula viable tendrá un citoplasma claro, mientras que una célula no viable tendrá un citoplasma azul (41).

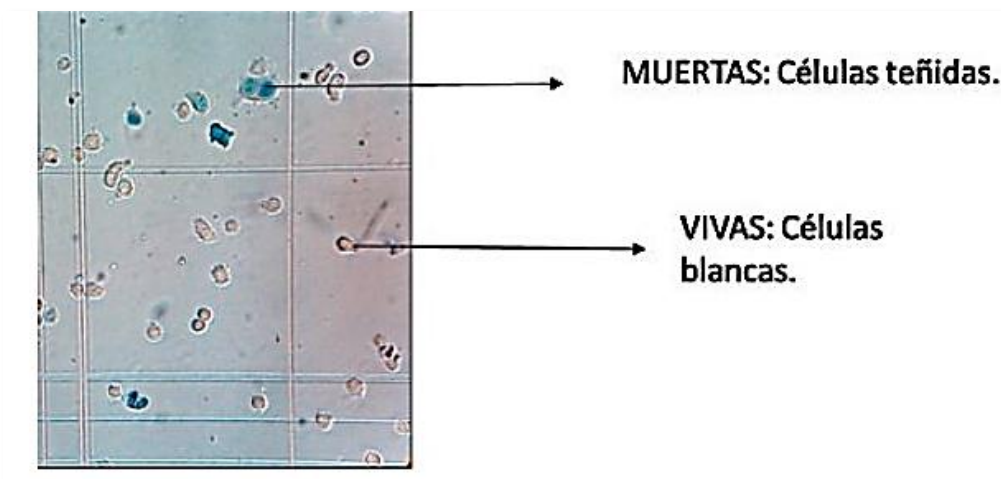


Figura 2. Viabilidad celular por la técnica de azul Tripán (42).

b. Determinación de Funcionalidad

La determinación de ingestión y muerte intracelular de levaduras por leucocitos PMN tiene por finalidad medir la capacidad funcional fagocítica de estas últimas.

Esta determinación requiere la incubación de PMN, adheridos a láminas de vidrio, con levaduras vivas (en proporciones adecuadas) en presencia de factores opsonicos termoestables (IgG específica) y termolábiles (C3b) del plasma del paciente que facilitan la adherencia e ingestión de las levaduras por los leucocitos PMN (43).

Posteriormente se observa al microscopio de luz contando un total de 100 células que hayan fagocitado, anotando por separado las levaduras azules (muertas) y las refringentes (vivas) en cada célula fagocítica, previa coloración con azul de metileno. Determinando de esa manera el índice fagocítico y el porcentaje de muerte (43).

c. Test del rango de crecimiento de levaduras.

El efecto citotóxico de sustancias químicas sobre células levaduriformes (*Saccharomyces cerevisiae*) en cultivos es determinado por la inhibición de la proliferación celular así como por la medida de la densidad celular (43).

2.2.11. Fagocitosis

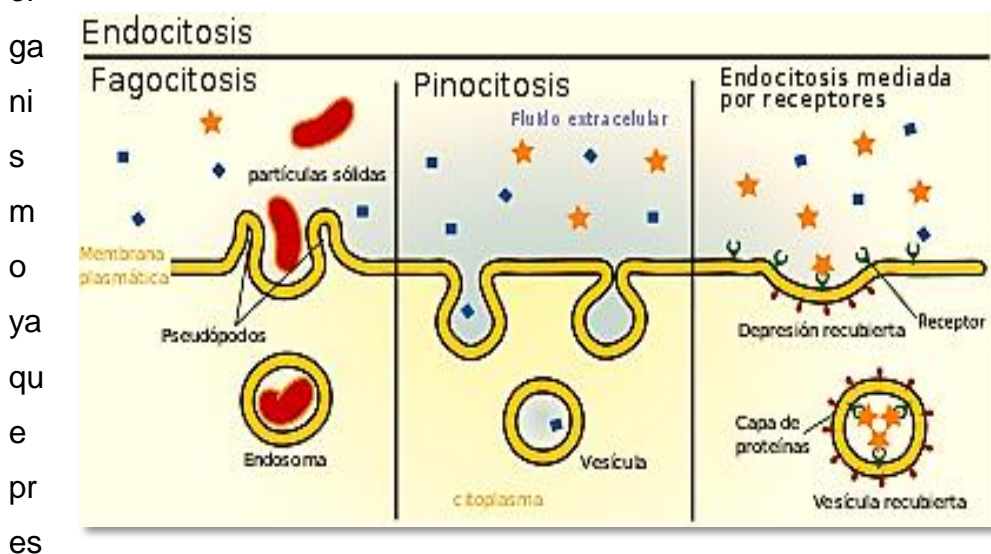
La fagocitosis es el proceso por el cual células especializadas buscan, localizan, identifican e introducen a su citoplasma partículas, gérmenes o células extrañas para destruirlas y extraer de ellas los inmunógenos que deben presentar a los linfocitos. Esta función es ejercida principalmente por polimorfonucleares, macrófagos y células dendríticas conocidas como células fagocíticas profesionales, así como por las células fijas, que integran el sistema llamado monocitos-macrófagos o retículo endotelial, ubicado en el hígado, bazo, ganglio linfáticos y médula ósea (44).

Figura 3. Proceso de fagocitosis (45).

2.2.12. Polimorfonucleares

Los polimorfonucleares son parte del sistema inmune innato no específico y se encuentran en la médula ósea, sangre, bazo, hígado y pulmones. Cuando se presenta un proceso infeccioso las primeras células en ser llamadas al lugar para combatir son los polimorfonucleares ya que tienen la capacidad de eliminar a los patógenos mediante la fagocitosis y el empleo de múltiples mecanismos (46).

Por ejemplo cuando la célula está dañada, los Basófilos liberan histamina produciendo inflamación, participan en los procesos alérgicos y evitan la coagulación sanguínea. Los Eosinófilos luchan contra ataques virales al



entran RNAsas (enzimas que degradan ARN), participan en episodios alérgicos y en el asma, actúan ante la presencia de parásitos y tienen la capacidad para fagocitar pero en un nivel bajo (46). Teniendo en la primera

línea de defensa frente a una lesión en el tejido a los neutrófilos luchando contra numerosos patógenos infecciosos como hongos, virus y bacterias donde los reconocen y fagocitan a los microorganismos invasores, para matarlos a través de diferentes mecanismos citotóxicos (47).

Los mismos polimorfonucleares se encargan de atraer más células inmunes al lugar de combate por la producción de IL-17 y de leucotrieno LTB4 (44).

2.2.13. Levaduras

Las levaduras son filogénicamente un grupo de hongos unicelulares en los cuales las fases teleomorfas o sexuales de división celular se dan por fisión o gemación (48).

La estructura celular de las levaduras es de tipo eucariótico pero sin sistema fotosintético, con pared rígida que se caracteriza por la presencia en su composición de dos polisacáridos: el manano y el glucano. Algunas levaduras producen una capsula constituida por fosfomananos. El núcleo está rodeado de una membrana que persiste durante la división celular. El número de cromosomas es variable (49).

2.3. Hipótesis

2.3.1. Hipótesis Principal

- Dado a que existen estudios sobre la toxicidad de los compuestos de la *Moringa oleifera*; es probable que, pueda existir un efecto citotóxico del extracto acuoso de *Moringa oleifera* sobre Polimorfonucleares sanguíneos humanos.

2.3.2. Hipótesis Secundarias

- Es probable obtener el porcentaje de viabilidad y de funcionalidad de PMNs sanguíneos humanos sometidos al extracto acuoso de *Moringa oleifera* al 2%.

- Es probable obtener el porcentaje de viabilidad y de funcionalidad de PMNs sanguíneos humanos sometidos al extracto acuoso de *Moringa oleifera* al 3%.
- Es probable obtener el porcentaje de viabilidad y de funcionalidad de PMNs sanguíneos humanos sometidos al extracto acuoso de *Moringa oleifera* al 5%.
- Es probable Comparar el porcentaje de viabilidad y funcionalidad de polimorfonucleares sanguíneos humanos sometidos al extracto acuoso de *Moringa oleifera* al 2%, 3%, 5% con PMNs inmersos en PBS (control negativo) y con los índices de viabilidad y efectividad fagocítica respectivamente.

2.4. Variables:

2.4.1. Identificación de Variables

Variable Independiente:

Extracto acuoso de *Moringa oleifera* Lam.

Variable Dependiente:

Citotoxicidad sobre polimorfonucleares.

2.4.2. Definición conceptual de variables

Variable Independiente:

El extracto acuoso de *Moringa oleifera*: Que se obtuvo en las concentraciones de 2%, 3% y 5%.

Variable Dependiente:

Citotoxicidad sobre polimorfonucleares: Que fue determinado según al resultado de índice de viabilidad.

2.5. Operacionalización de Variables

Tabla 2. Operacionalización de Variables

VARIABLE INDEPENDIENTE	INDICADOR	SUBINDICADOR
Extracto acuoso de la <i>Moringa oleifera</i> Lam	Concentración del extracto	2% 3% 5%

VARIABLE DEPENDIENTE	DIMENSIONES	INDICADOR	SUBINDICADOR
-----------------------------	--------------------	------------------	---------------------

	Viabilidad celular	Porcentaje de viabilidad	Índice de viabilidad
Citotoxicidad de Polimorfonucleares	Funcionalidad celular	Porcentaje de funcionalidad	Índice de eficiencia fagocítica

Fuente. Elaboración propia

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

2.6. Nivel, Tipo y Diseño de la Investigación:

2.6.1. Nivel de la Investigación

- Experimental

2.6.2. Tipo de Investigación

➤ Según manipulación de variables:

- Experimental.

➤ Según número de mediciones:

- Longitudinal

➤ **Según la temporalidad**

- Prospectivo

➤ **Enfoque**

- Cuantitativo

➤ **Paradigma**

- Positivista

2.6.3. Diseño de la Investigación

- Experimental

2.7. Descripción de ámbito de la investigación

2.7.1. Ámbito de Estudio

Ubicación espacial

- El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de la Universidad Privada Autónoma del Sur de Arequipa.

Ubicación temporal

- El presente trabajo de investigación fue realizado durante los meses de noviembre del 2019 a marzo de 2020.

2.7.2. Unidad de Estudio:

Identificación de la Unidad de Estudio

- Hojas de *Moringa oleifera*

2.8. Población , muestra y muestreo

2.8.1. Población

- Planta de *Moringa oleifera*

2.8.2. Muestra

- Hojas de *Moringa oleifera*

A. Criterios de Inclusión

- Hojas completas,
- Color uniforme.

B. Criterios de Exclusión

- Tallo , raíz, fruto de *Moringa oleifera*
- Hojas en mal estado aparentemente enfermas

2.8.3. Muestreo

- No probabilístico

2.9. Técnicas e instrumentos de recojo de datos

2.9.1. Materiales, equipos y reactivos

a. Equipos

- Microscopio óptico
- Balanza analítica
- Cocina
- Incubadora
- Autoclave

b. Reactivos

- Azul de Metileno 3%
- Azul de Tripán 0.4%
- Buffer Fosfato Salino (PBS)
- Metanol 99.9%

c. Materiales biológicos y afines

- Extracto acuoso de *Moringa oleifera* Lam
- Levadura *Saccharomyces cerevisiae* activada
- Muestra de sangre venosa
- Sacarosa

- Alcohol
- Agua Destilada

d. Materiales

- Placas Petri
- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos
- Beaker de 500 mL
- Beaker de 400 mL
- Beaker de 150 mL
- Beaker de 100 mL
- Probeta 100 mL
- Fiola 100 mL
- Píseta 250 mL
- Pipeta Graduada
- Pipeta Pasteur
- Frasco de vidrio
- Varilla
- Espátula
- Gotero
- Papel filtro
- Papel craft
- Papel toalla
- Gasa
- Algodón
- Guantes Quirúrgicos

- Aguja n° 21
- Jeringa 5 mL
- Algodón
- Aguja n° 21
- Jeringa 5 mL
- Bisturí n° 21
- Ligadura
- Pabilo
- Tijera
- Marcador

2.10. Procedimiento

2.10.1. Preparación del Extracto Acuoso

Para la elaboración del extracto acuoso de *Moringa oleifera*, se tomaron 50 gramos de hojas secas de *Moringa* las cuales se colocaron en un beaker al que se le añadió 500 mL de agua destilada a 90°C, enseguida se procedió a homogenizar y se dejó en reposo por 30 minutos, pasado este tiempo, se filtró primero a través de una gasa fina y luego por papel filtro ultra rápido.

En la estufa se colocó el solvente obtenido a una temperatura de 37°C por un tiempo de tres días; dando como resultado el extracto seco de *Moringa oleifera* con un peso de 10 gramos, luego se esterilizó en una autoclave a 121°C por 15 minutos.

Para preparar las diferentes concentraciones de *Moringa* se procedió a reconstituir el extracto seco en agua destilada a 90°C según las concentraciones de 2%, 3% y 5% de *Moringa oleifera*.

2.10.2. Activación de la levadura

En un beaker se colocó 25 mL de agua destilada seguidamente se añadió 5 g de sacarosa y 10 g de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), se procedió a homogeneizar con una varilla y finalmente se llevó a la estufa a una temperatura de 37°C, por un tiempo de 40 minutos hasta su activación, es decir la presencia de espuma (43).

2.10.3. Obtención de polimorfonucleares

Se extrajo una muestra de sangre venosa periférica de un donante sano para la obtención de polimorfonucleares. Para lo cual se colocaron dos gotas grandes separadas de sangre en cada lámina portaobjeto estándar, Se preparó una cámara húmeda, colocando en la placa Petri un papel filtro humedecido con Buffer Fosfato Salino (PBS).

Se colocó la lámina en la cámara húmeda y se llevó a incubar a 37°C en una estufa por 30 minutos

Transcurrido el tiempo mencionado, se procedió a retirar las láminas de la cámara húmeda; y se cubrió las gotas de sangre con PBS por un minuto, luego se desprendió delicadamente los bordes de los coágulos con una aguja estéril, removiendo el coágulo mediante chorro continuo de PBS con pipeta Pasteur; y así se obtuvieron dos muestras de polimorfonucleares adheridos por cada lámina portaobjeto y se dejó secar por 3 minutos las muestras de polimorfonucleares para posteriormente fijarlo con 1-2 gotas de metanol en cada muestra hasta la evaporación del metanol. Trabajando finalmente con 32 muestras fijadas de polimorfonucleares.

2.10.4. Grupo control

Para el caso del grupo "Control" se prepararon 8 muestras que contienen polimorfonucleares las cuales se cubrieron con 0.5 mililitros de PBS, y fueron colocadas en cámara húmeda (PBS) y llevadas a la estufa a una temperatura de 37°C por un tiempo de 30 minutos.

2.10.5. Exposición a *Moringa oleifera*

Para el caso del grupo "Muestra" se prepararon 24 muestras que contienen polimorfonucleares las cuales se dividieron en 3 grupos de 8 cada uno para luego añadir 0.5 mililitros del extracto en las concentraciones de 2%, 3% y 5% donde posteriormente fueron colocadas en cámara húmeda (PBS) y llevadas a la estufa a una temperatura de 37°C por un tiempo de 30 minutos.

2.10.6. Prueba de viabilidad

Transcurrido los 30 minutos de incubación a exposición con el extracto, se procedió al retiro de las láminas y se eliminó el exceso del extracto para de inmediato ser enjuagados con PBS y dejarlos secar a temperatura ambiente por 3 minutos para luego colocar 2 gotas de solución de azul Tripán al 0.4% cubriendo de esta manera el área donde se encuentran los polimorfonucleares por un lapso de 10 minutos; para después enjuagarlos con PBS y cubrirlo con un cubreobjeto. Dentro de los 5 minutos siguientes se procedió al conteo celular en el microscopio óptico binocular con objetivo 40X (43).

Para hallar el porcentaje de viabilidad de cada muestra se tomó en cuenta el número de células viables sobre el número total de células contadas por el 100%.

$$\text{Porcentaje de Viabilidad} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células viables}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de células contadas}} \times 100$$

Después se calculó la media del porcentaje de viabilidad de las concentraciones del extracto con *Moringa* al 2%, 3% y 5%.

Luego estos resultados fueron comparados con el índice de viabilidad hallada con la siguiente formula:

$$\text{Índice de Viabilidad} = \frac{\text{Promedio de porcentaje de viabilidad de las muestras}}{\text{Promedio de porcentaje de viabilidad de los controles}} \times 100$$

2.10.7. Prueba de funcionalidad

Pasados los 30 minutos de incubación a exposición con el extracto, se enjuagaron las muestras con PBS para después añadir 0.5 mL de solución de levadura preparada previamente y así llevándolo enseguida a incubar por 30 minutos a 37°C en cámara húmeda (PBS). Posteriormente se retiraron las láminas de la cámara húmeda y se enjuagaron con PBS dejándolos secar por un minuto. Inmediatamente se procedió a colorearlas con 2 gotas de Azul de Metileno al 3% por 5 minutos transcurrido dicho tiempo se procedió a enjuagarlas con PBS dejándolos secar a temperatura ambiente por 1 minuto. Y se contabilizaron el número de polimorfonucleares que han fagocitado levaduras “discriminándose de las células que no han fagocitado con un total de 20 polimorfonucleares, en un microscopio óptico binocular con objetivo 40x (43).

Seguidamente se determinó el porcentaje de funcionalidad que fue calculada con la siguiente formula:

$$\text{Porcentaje de funcionalidad} = \frac{\text{Nº de células con capacidad fagocítica}}{\text{Nº total de células contadas}} \times 100$$

Se calculó la media del porcentaje de funcionalidad de las

concentraciones del extracto con *Moringa oleifera* al 2%, 3% y 5%.

Luego estos resultados fueron comparados con la eficiencia fagocítica hallada con la siguiente formula.

$$\text{Eficiencia fagocítica} = \frac{\text{Promedio de \% funcionalidad de las muestras}}{\text{Promedio de \% funcionalidad del control negativo}} \times 100$$

2.11. Análisis estadístico

Los datos de los resultados de porcentajes de viabilidad y funcionalidad de los PMNs ingresaron al programa SPSS versión 23 para los siguientes análisis estadísticos, utilizando una probabilidad (p) de 0.05:

- Descripción de medias y desviaciones de los datos según tratamientos
- Análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la diferenciación estadística entre tratamientos.
- Prueba de diferenciación de medias de Tukey

DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Moringa oleifera* EN POLIMORFONUCLEARES DE HUMANO

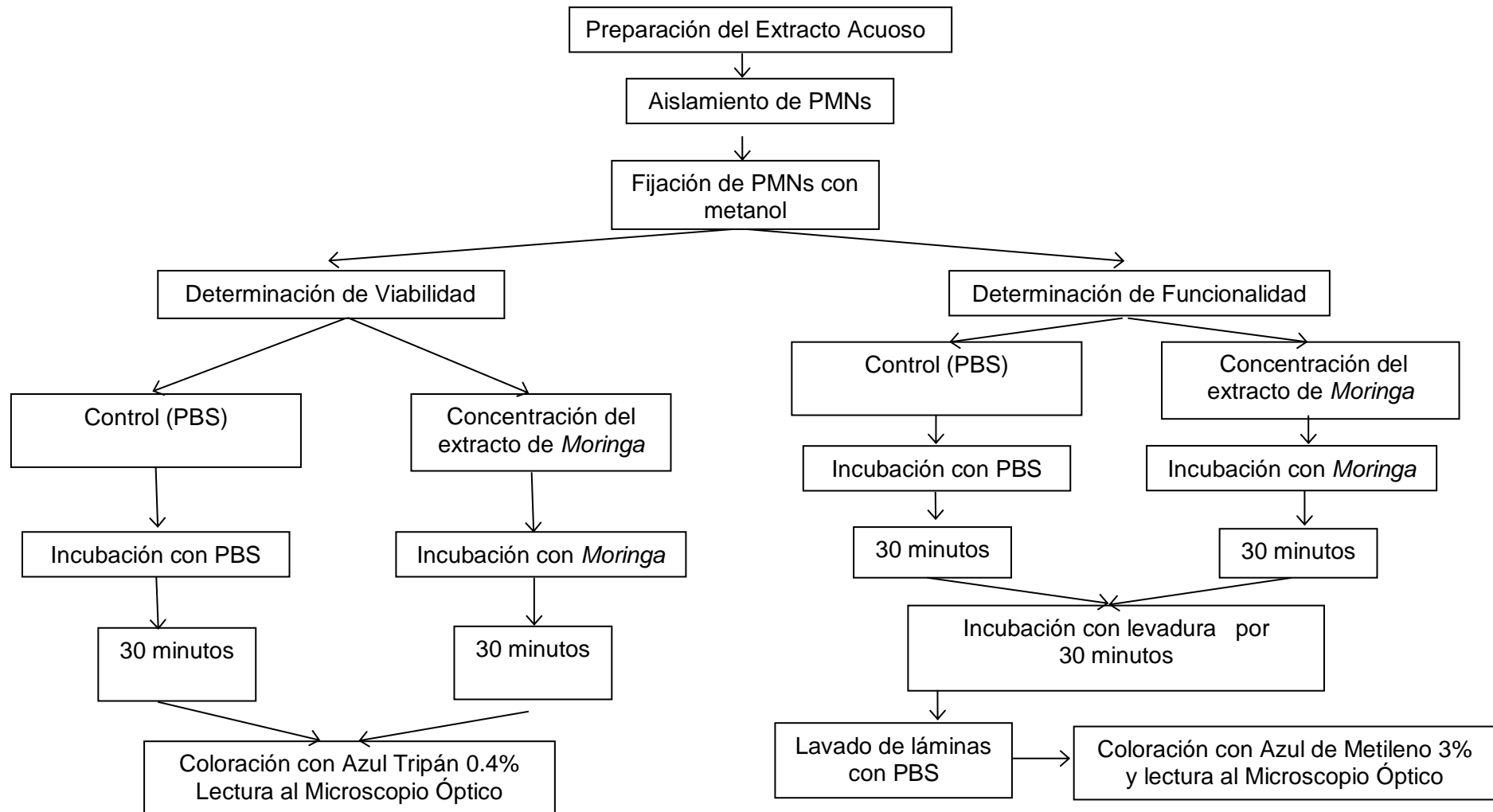


Figura 4. Mapa conceptual de procedimiento.

Fuente. Elaboración propia

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de la Universidad Privada Autónoma del Sur, entre los meses de noviembre del 2019 a marzo del 2020, obteniéndose los siguientes resultados:

4.1. Preparación del Extracto Acuoso

Se logró obtener el extracto acuoso de *M. oleifera* a partir de 50 gramos de hojas secas reposadas a 90°C en 500 mL de agua destilada, el que posteriormente se filtró y evaporó a 37°C durante 72 horas, resultando 10 gramos de polvo seco del extracto.

El polvo esterilizado de *Moringa oleifera* se reconstituyó en agua destilada a las concentraciones de 2%, 3% y 5%.

4.2. Activación de la levadura

Las células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se activaron a 37°C en sacarosa al 5%.

4.3. Obtención de polimorfonucleares y exposición a *Moringa oleifera*

Se obtuvieron 32 muestras de polimorfonucleares adheridos en láminas portaobjetos a partir de sangre venosa. Para poder evaluar la citotoxicidad se aplicó el extracto acuoso a la concentración 2, 3 y 5% a las láminas preparadas distribuyéndose en tratamientos y en control y subdividiéndose en subgrupos de cuatro repeticiones cada uno para evaluar viabilidad y funcionalidad, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Distribución de tratamientos y controles para evaluar viabilidad y funcionalidad de los polimorfonucleares después de su exposición al extracto acuoso de *M. oleifera*.

Concentración del extracto de <i>Moringa oleifera</i>	Muestras para evaluar viabilidad celular	Muestras para evaluar funcionalidad celular
Control	M-1	M-5
	M-2	M-6
	M-3	M-7
	M-4	M-8
2%	M-1	M-5
	M-2	M-6
	M-3	M-7
	M-4	M-8
3%	M-1	M-5
	M-2	M-6
	M-3	M-7
	M-4	M-8
5%	M-1	M-5
	M-2	M-6
	M-3	M-7
	M-4	M-8

Fuente. Elaboración propia.

4.4. Prueba de viabilidad

A las láminas con polimorfonucleares control y a las sometidas al extracto de *M. oleifera* al 2%, 3% y 5% se les agregó Azul Tripán al 0.4% y se observó al microscopio con objetivo de 40X, para su conteo de un total de 100 células por muestra, y luego se determinó el porcentaje de viabilidad, los resultados se observan en la Tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de polimorfonucleares en la prueba de viabilidad celular

Unidades	Tratamientos	% viabilidad PMNs
1		100.00
2		100.00
3	PBS (control negativo)	100.00
4		100.00
5		88.00
6		94.00
7	Extracto <i>M. oleifera</i> 2%	83.00
8		88.00
9		100.00
10		100.00
11	Extracto <i>M. oleifera</i> 3%	83.00
12		72.00
13		55.00
14		72.00
15	Extracto <i>M. oleifera</i> 5%	66.00
16		72.00

Fuente. Elaboración propia

Además, se calculó el índice de viabilidad para este grupo de muestras, a partir de la media del porcentaje de viabilidad de las muestras sometidas a diferentes concentraciones del extracto y de la media de las muestras control, siendo 81% el índice de viabilidad.

$$\text{Índice de Viabilidad} = \frac{81}{100} \times 100$$

$$\text{Índice de Viabilidad} = 81\%$$

4.4.1. Análisis estadístico de la viabilidad celular

Tabla 5. Descripción estadística del porcentaje de viabilidad de PMNs de sangre venosa humana sometidos a extracto de *M. oleifera*

Tratamientos	N	Media	Desviación estándar	Desviación Error
PBS (control negativo)	4	100.00	0.000	0.000
Extracto <i>M. oleifera</i> 2%	4	88.25	4.500	2.250
Extracto <i>M. oleifera</i> 3%	4	88.75	13.745	6.872
Extracto <i>M. oleifera</i> 5%	4	66.25	8.016	4.008
Total	16	85.81	14.639	3.660

Fuente. Elaboración propia

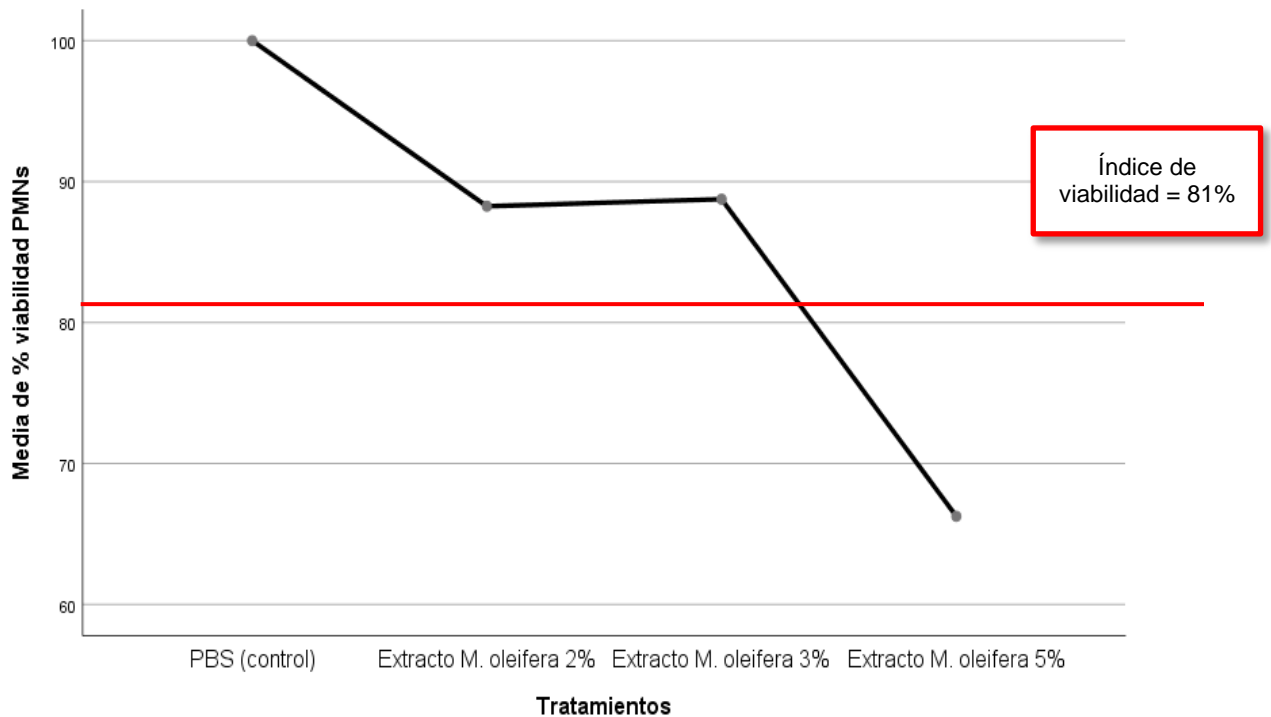


Figura 5. Índice de viabilidad.

Fuente. Elaboración propia

La tabla 5 nos permite comparar las medias y desviaciones estándar de los porcentajes de viabilidad de los PMNs sometidos a los tratamientos del extracto acuoso de *M. oleifera* y al control negativo (PBS). Además, la figura 5 compara estas medias con el índice de viabilidad (81%), observándose que sólo la media del tratamiento del extracto *M. oleifera* al 5% está por debajo del índice.

Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de viabilidad de PMNs sometidos al extracto de *M. oleifera*

	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Significancia (p<0.05)
Entre grupos	2394.188	3	798.063	11.675	0.001
Dentro de grupos	820.250	12	68.354		
Total	3214.438	15			

*GL grados de libertad

Fuente. Elaboración propia

En la tabla 6 se puede observar en la prueba de ANOVA, una significancia de 0.001, la que es menor a $p < 0.05$, lo que indica que hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos y las unidades de estudio, es decir, entre las medias de porcentaje de viabilidad de los PMNs sometidos a los tratamientos control negativo y los extractos de *M. oleifera*.

Tabla 7. Comparación de medias de los porcentajes de viabilidad de PMNs sometidos al extracto de *M. oleifera* mediante la Prueba de Tukey

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa=0.05	
		1	2
Extracto <i>M. oleifera</i> 5%	4	66.25	
Extracto <i>M. oleifera</i> 2%	4		88.25
Extracto <i>M. oleifera</i> 3%	4		88.75
PBS (control negativo)	4		100.00
	Sig.	1.000	0.238

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Fuente. Elaboración propia

En la tabla 7 se muestran los resultados de la comparación de medias de los tratamientos según la prueba de diferenciación de Tukey ($p < 0.05$), encontrándose que hay diferencia significativa entre el porcentaje de viabilidad de los PMNs sometidos al extracto de *Moringa oleifera* al 5% (subconjunto 1) y los demás tratamientos (subconjunto 2), es decir, los extractos al 2 y 3 % y el control negativo (PBS); sin embargo, se muestra que entre los demás tratamientos, porcentajes de PMNs sometidos a los extractos de *M. oleifera* al 2 y 3% y el control negativo (PBS), no hay diferencia estadísticamente significativa, lo que demuestra que la viabilidad celular de los polimorfonucleares solo se ve afectada por el extracto al 5%, ya que los extractos al 2 y 3% no afectarían su viabilidad al ser estadísticamente semejantes al grupo control.

4.5. Prueba de funcionalidad

Se determinó el porcentaje de funcionalidad de láminas preparadas con polimorfonucleares sometidas al extracto de *M. oleifera* a las concentraciones de 2, 3 y 5%, a las cuales se les estimuló su capacidad fagocítica aplicándoles levaduras, luego de ser teñidas con azul de metileno y del conteo al microscopio de 100 células por vez, identificando las que se encuentran fagocitando por lo menos una partícula de levadura; los resultados se observan en la Tabla 8.

Tabla 8. Prueba de funcionalidad de polimorfonucleares frente al extracto de *M. oleifera*.

Unidades	Tratamientos	% funcionalidad
		PMNs
1		100
2	PBS (control)	100
3		100
4		100
5		78
6	Extracto <i>M. oleifera</i> 2%	84
7		73
8		89
9		73
10	Extracto <i>M. oleifera</i> 3%	68
11		73
12		73
13		68
14	Extracto <i>M. oleifera</i> 5%	63
15		68
16		63

Fuente. Elaboración propia

Finalmente, se calculó la media del porcentaje de funcionalidad de las concentraciones del extracto de *M. oleifera* al 2%, 3% y 5%, para hallar la eficiencia fagocítica media de los tratamientos con respecto al control negativo, la cual es de 72.75%.

$$\text{Eficiencia fagocítica} = \frac{73}{100} \times 100$$

$$\text{Eficiencia fagocítica} = 73\%$$

4.5.1. Análisis estadístico de la funcionalidad celular

Tabla 9. Estadísticos descriptivos del porcentaje de funcionalidad de PMNs de sangre venosa humana sometidos a extracto de *M. oleifera*.

	N	Media	Desviación Estándar	Desviación Error
PBS (control)	4	100.00	0.000	0.000
Extracto <i>M. oleifera</i> 2%	4	81.00	6.976	3.488
Extracto <i>M. oleifera</i> 3%	4	71.75	2.500	1.250
Extracto <i>M. oleifera</i> 5%	4	65.50	2.887	1.443
Total	16	79.56	13.914	3.478

Fuente. Elaboración propia

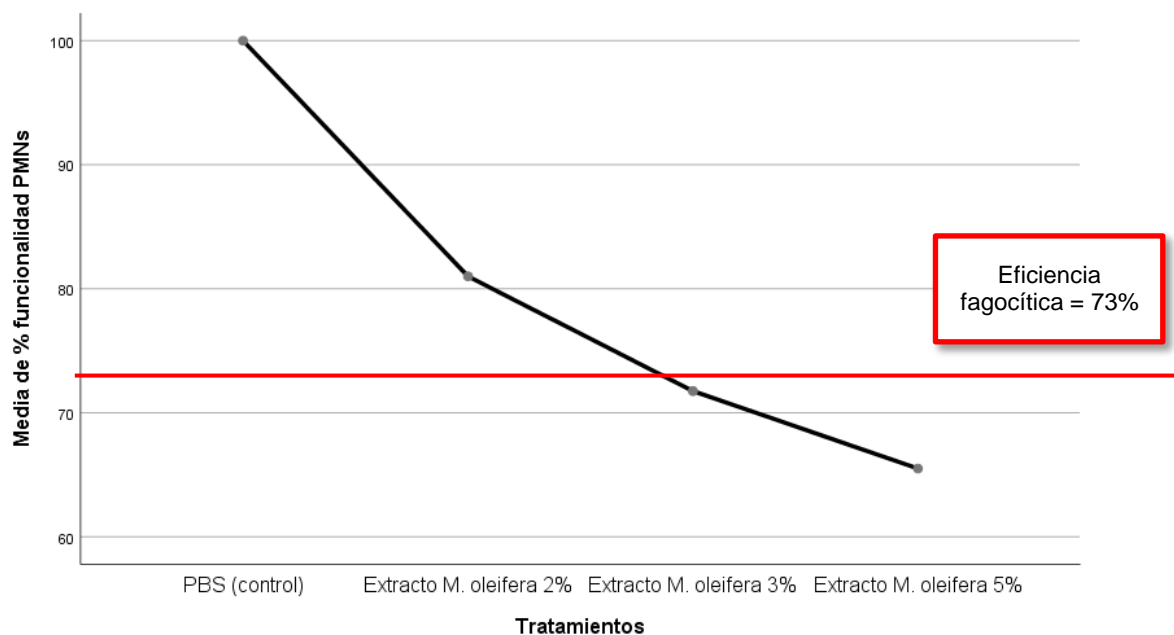


Figura 6. Eficiencia fagocítica

Fuente. Elaboración propia

La tabla 9 muestra las medias y desviaciones estándar de los porcentajes de funcionalidad de los PMNs estimulados por levaduras y sometidos a los tratamientos del extracto acuoso de *M. oleifera* y al control negativo (PBS). Además, la figura 5 compara estas medias con el porcentaje de eficiencia fagocítica (73%), observándose que las medias de los tratamientos del extracto *M. oleifera* al 3 y 5% está por debajo de este índice.

Tabla 10. Análisis de varianza de los porcentajes de funcionalidad de PMNs sometidos al extracto de *M. oleifera*

Tratamientos	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig. (p<0.05)
Entre grupos	2714.188	3	904.729	57.216	0.000
Dentro de grupos	189.750	12	15.813		
Total	2903.938	15			

Fuente. Elaboración propia

En la tabla 10 se puede observar en la prueba de ANOVA, una significancia de 0.000, la que es menor a $p < 0.05$, lo que indica que hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos y las unidades de estudio, es decir, entre las medias del porcentaje de funcionalidad de los PMNs sometidos a los tratamientos control negativo y extracto a diferentes concentraciones de *M. oleifera*.

Tabla 11. Comparación de medias de los porcentajes de funcionalidad de PMNs sometidos al extracto de *M. oleifera* mediante la Prueba de Tukey

		Subconjunto para alfa = 0.05		
Tratamientos	N	1	2	3
HSD Tukey^a Extracto <i>M. oleifera</i> 5%	4	65.50		
Extracto <i>M. oleifera</i> 3%	4	71.75		
Extracto <i>M. oleifera</i> 2%	4		81.00	
PBS (control negativo)	4			100.00
	Sig.	0.172	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Fuente. Elaboración propia

En la tabla 11, se muestra los resultados de la prueba de diferenciación de Tuckey ($p < 0.05$), hallándose diferencia significativa entre los porcentajes de funcionalidad de los extractos de *Moringa oleifera* al 3 y 5% (subconjunto 1) con el extracto *Moringa oleifera* al 2% (subconjunto 2) y el control negativo (subconjunto 3), sin embargo, entre ellos no hay diferencia estadística; así también, hay

diferencia significativa entre el porcentaje de funcionalidad de los PMNs sometidos al extracto al 2% con el control negativo.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se buscó determinar si el extracto acuoso de hojas de *Moringa oleifera* Lam tiene efecto citotóxico sobre polimorfonucleares (PMNs) de sangre venosa humana, lo cual se realizó preparando este extracto a concentraciones de 2, 3 y 5%, con lo que logramos determinar cuál de estas concentraciones se considera citotóxica mediante la determinación de viabilidad y funcionalidad de estas células, ya que son indicadores de citotoxicidad.

Respecto al extracto acuoso de *Moringa oleifera* Lam., el que se preparó a partir de hojas secas, mediante infusión y luego por desecación, nos dio un buen porcentaje de rendimiento de 20%, lo que coincide con lo encontrado por Linares y Quiñones *et al.* (2018) en Cuba, en su trabajo intitulado: Obtención de extractos fenólicos foliares de *Moringa oleifera* Lam., mediante el uso de diferentes métodos de extracción, ellos determinaron un rendimiento aproximadamente de 18.5 %, aunque ellos trabajaron con diferentes formas de extractos podemos ver que los rendimientos son semejantes (50).

Para la determinación de la viabilidad celular, se obtuvieron polimorfonucleares extraídos de sangre venosa, los que fueron fijados en láminas portaobjetos a través de su incubación en cámara humedecida con PBS a 37°C, obteniéndose la adherencia de una gran cantidad de células en la lámina, lo que permitió discriminar a las células viables, al contrastarse con células muertas y detritus orgánico teñidas con el azul Tripán al 0.4%, y esto se debe a que, las células vivas tienen la membrana citoplasmática íntegra, lo que no permite el ingreso del colorante, tal como lo indican los diferentes estudios de Valdes *et al.* (2011), Repetto M (2002), Stoddart MJ (2009) y Monroy *et al.* (2005); los que utilizan el azul Tripán en sus evaluaciones de viabilidad celular. Además, el recuento celular de PMNs en las muestras del grupo control negativo fue óptimo, debido a que

estas células se sometieron a PBS, una solución fisiológica que las mantiene viables, lo que permitió calcular el índice de viabilidad de las muestras tratadas con respecto al porcentaje del control negativo, el cual fue de 81%, cifra que está por encima del porcentaje adecuado de este índice, el cual, según Monroy et al. (2005) debe ser mayor a 80% para considerarse no citotóxico (51).

Como podemos observar en la Tabla 4 y en la Figura 4, el extracto acuoso de *M. oleifera* a la concentración de 2% produjo un promedio de 88,25% de viabilidad en los polimorfonucleares sanguíneos humanos, el mismo extracto a la concentración del 3% produjo un promedio de viabilidad de PMNs de 88,75% y para la concentración de 5% del extracto se obtuvo un promedio de viabilidad de 66,25%; es decir, que las concentraciones al 2 y al 3% presentan porcentajes de viabilidad por encima del índice viabilidad de 81% obtenido en este estudio, mientras que el extracto al 5% al estar por debajo de 81% (66,25%) se consideraría citotóxico para estas células; así también, los cálculos estadísticos corroborarán estos resultados, ya que se halló que no habría diferencia estadística significativa entre las concentraciones al 2 y al 3% del extracto con el grupo control negativo, al cual sólo se le sometió a la solución fisiológica de PBS, lo que indicaría que a estas concentraciones las células se mantienen viables, en tanto, la concentración al 5% si presento diferencia estadística con los extractos al 2 y 3% y con el grupo control, lo que indicaría que si presenta citotoxicidad a esta concentración del extracto de *M. oleifera*.

Al comparar nuestros resultados de viabilidad celular con el trabajo realizado por Zavala C (2004), quien realizó un estudio similar evaluando la citotoxicidad del extracto de *Erythrina falcata*, sobre polimorfonucleares humanos, registró un índice de viabilidad de 85%. Además, comparamos nuestros datos con los hallazgos encontrados por Adedapo et al. (2009), quienes evaluaron la toxicidad aguda del extracto de *Moringa oleifera* en ratas, aplicándolo por vía oral; en el resultado de la prueba de toxicidad aguda, observaron que este extracto no causó la muerte en animales incluso a dosis de 2000 mg/kg (equivalente al 2%) y en los datos de toxicidad subaguda con este extracto a 400, 800 y 1600 mg/kg no causaron cambios significativos en los parámetros hematológicos, bioquímicos e histológicos, concluyendo que el extracto de *Moringa oleifera* es

relativamente segura para uso medicinal y nutricional.

También, el trabajo de Asare *et al.* (2011), en el que realizaron un estudio sobre los efectos de toxicidad del extracto acuoso de la *Moringa oleifera* en ratas, evaluado en forma observacional, hematológico y bioquímico concluyeron que las ratas no mostraron cambios en el comportamiento antes ni después de la administración de todos los niveles de dosis; por lo tanto, no registraron toxicidad, tampoco se registró mortalidad, a niveles de dosis altas de 3000 mg/kg (correspondiente a 3%) y su potencial citotóxico de *Moringa oleifera* a la concentración de 5 a 10 mg/ml fue capaz de inducir la liberación de LDH.

Respecto a la funcionalidad de los polimorfonucleares, se evaluó su efectividad fagocítica, a los que luego de haberlos sometido a una de las tres diferentes concentraciones del extracto de *M. oleifera* y un grupo control sin aplicar el extracto, se les observó al estudio microscópico 40x, fagocitando o que habían realizado fagocitosis de una levadura gracias a su tinción con azul de metileno, registrándose el porcentaje de células con actividad fagocítica. El porcentaje de eficiencia fagocítica hallado a partir de las muestras sometidas al efecto del extracto de *M. oleifera* respecto al porcentaje del control negativo fue de 73%, cifra que supera el porcentaje mínimo recomendado para este índice, 70%, como se menciona en el trabajo de Torres *et al.* (2004) (52).

Los resultados obtenidos en esta evaluación se muestran en la Tabla 8, en la que se puede apreciar que a la concentración de 2% de *M. oleifera* tenemos una funcionalidad promedio de 81%, a la concentración de 3% se observa un porcentaje de funcionalidad del 71.75% y a la concentración de 5% se determinó una funcionalidad promedio de 65.5%. Según la prueba estadística de ANOVA, existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, entonces, con la prueba de Tukey se distinguió que la capacidad fagocítica de los polimorfonucleares sometidos a la concentración al 2% es semejante a la funcionalidad del control negativo y estadísticamente superior a las otras concentraciones; es decir, a esta concentración del extracto los PMNs se ven menos afectados que a las de 3 y 5%, ya que estas dos últimas concentraciones

se puede apreciar que estadísticamente son inferiores a la concentración del 2% y al control negativo, lo que indicaría que son citotóxicas al extracto de *M. oleifera*.

Nuestros resultados se podrían corroborar con los obtenidos por Kasolo *et.al.*, (2012), quienes realizaron un estudio determinando la toxicidad subaguda de los extractos acuosos y de etanol de las hojas de *Moringa oleifera* en ratas sacrificándolas para luego extraer sangre de los ventrículos del corazón para realizar el estudio, por medio de parámetros hematológicos y séricos para indicar daños a nivel hepático, renal y cardiaco. Que vendría a representar la funcionabilidad orgánica. Donde se resuelve una baja toxicidad en las hojas, con una DL50 para el extracto en etanol de 17.8 g/kg pc y 15.9 g/kg pc para el extracto acuoso, por ello puede que siga siendo consumido para usos medicinales, pero también no se descarta que a dosis altas puede provocar efectos tóxicos. Donde hubo un aumento significativo en los glóbulos blancos (leucocitosis) que ingirieron varias dosis más altas del extracto de hojas *M. oleifera*.

También, se puede comparar con el ensayo realizado por Ambi *et al.* (2011), En el que se incorporó un triturado de moringa, en diversos porcentajes, a la dieta de ratones albinos, encontrando que un 75% de *Moringa* en la dieta diaria, consumida durante 93 días, causa degeneración grasa de hígado, con áreas focales de necrosis, presumiblemente debido al aumento de producción enzimática, e infiltración celular a los intersticios, además de necrosis de bazo y células linfoides e incluso degeneración neuronal por necrosis de las células gliales.

Evaluando los resultados obtenidos en el presente trabajo, se evidencia que tanto la viabilidad celular como la funcionalidad de los polimorfonucleares como indicadores de citotoxicidad, aumentan a medida que la concentración del extracto acuoso de *Moringa oleifera* disminuye, siendo el extracto acuoso de *Moringa oleifera* al 2 % la concentración recomendable ya que sería la menos citotóxica por mantener porcentajes de viabilidad y funcionalidad aceptables, ya que están por encima de los índices de viabilidad y eficiencia fagocítica, por tanto,

se puede aplicar el extracto acuoso de *Moringa oleifera* a esta concentración en sistemas biológicos e in vivo por sus efectos medicinales beneficiosos.

CONCLUSIONES

Primera: El porcentaje de viabilidad celular de polimorfonucleares sometidos al extracto acuoso de *Moringa oleifera* a una concentración del 2% fue de 88,25% y de funcionalidad fue de 81%.

Segunda: El porcentaje de viabilidad celular de polimorfonucleares sometidos al extracto acuoso de *Moringa oleifera* a una concentración del 3% fue de 88,75% y de funcionalidad fue de 71,75%.

Tercera: El porcentaje de viabilidad celular de polimorfonucleares sometidos al extracto acuoso de *Moringa oleifera* a una concentración del 5% fue de 66,25% y de funcionalidad fue de 61,50%.

Cuarta: Al compararse los porcentajes de viabilidad hallados con el índice de viabilidad celular, 81%, y con el control negativo (PBS) se determinó que las concentraciones de 2 y 3% se encuentran por encima de este índice y porcentajes estadísticamente semejantes al control negativo, mientras que la concentración de 5% se encuentra por debajo de su índice correspondiente y porcentajes estadísticamente diferentes al control negativo, lo que nos indica que esta última concentración es citotóxica para polimorfonucleares humanos.

Y al compararse los porcentajes de funcionalidad hallados con el índice de eficiencia fagocítica, 73%, y con el control negativo (PBS) se determinó que la concentración de 2% se encuentra por encima de este índice y porcentajes semejantes al control negativo, mientras que las concentraciones de 3 y 5% se encuentran por debajo de su índice correspondiente y porcentajes estadísticamente diferentes al control negativo, lo que nos indica que esta dos últimas concentraciones son citotóxicas para polimorfonucleares humanos.

Quinta: Se determinó que el extracto acuoso de las hojas *Moringa oleifera* Lam presenta un efecto citotóxico sobre polimorfonucleares sanguíneos humanos a las

concentraciones de 3 y 5%, debido a que afectan a su viabilidad celular y/o capacidad fagocítica.

RECOMENDACIONES

PRIMERA. Se recomienda realizar estudios para la determinación la citotoxicidad crónica o genotoxicidad del extracto acuoso de hojas de *Moringa oleifera* Lam.

SEGUNDA. Se recomienda que a partir del presente trabajo se puedan realizar estudios in vivo para evaluar los efectos medicinales del extracto acuoso de *Moringa oleifera* a concentraciones tan bajas como al 2%.