



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
NATURALEZA (ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA- TRABAJO DE
CONCLUSION DE CURSO**

EVALUACION DE LOS EFECTOS ANTITUMORALES DE
Genipa americana

JOHANA ESTHER REGALADO MARTÍNEZ

Foz de Iguazú

2021

EVALUACION DE LOS EFECTOS ANTITUMORALES DE *Genipa americana*

JOHANA ESTHER REGALADO MARTÍNEZ

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latino-Americano de Ciencias de vida y de la naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latino-Americana, como requisito parcial a la obtención del título de Bacharel em Biotecnología.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luís Maria Ruiz

Foz de Iguazú

2021

JOHANA ESTHER REGALADO MARTÍNEZ

EVALUACION DE LOS EFECTOS ANTITUMORALES DE
Genipa americana

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latino-Americano de Ciencias de vida y de la naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latino-Americana, como requisito parcial a la obtención del título de Bacharel en Biotecnología.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luís María Ruiz
UNILA

Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana
UNILA

Prof. Dra. Leticia Priscilla Arantes
UNILA

Foz do Iguazu, 04 de Octubre de 2021.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Johana Esther Regalado Martínez

Curso: Biotecnología

Tipo de Documento	
(X) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	(.....) trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....) _____

Título do trabalho acadêmico: Evaluación de los efectos antitumorales de *Genipa Americana*

Nome do orientador(a): Dr. Jorge Luís Maria Ruiz

Data da Defesa: 04 / Octubre / 2021

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública [Creative Commons Licença 3.0 Unported](#).

Foz do Iguaçu, 04 de Octubre de 2021.

Assinatura do Responsável

Dedico este trabajo a YHWH ISHÍ quien fue y es mi compañía, mi ayuda y más grande consejero, quien ha saciado mi soledad con su agua y me ha llenado de su amor y fidelidad.

Al amor verdadero y quien permanece cuando nadie esta, mi amigo, mi sanador, a mi Padre, hermano mayor y quien me ha amado desde la eternidad pasada, hasta la eternidad futura. A Él sea dada la Gloria, por dejarme conocer un poco más de su creación.

AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a mi Dios por su amor y fidelidad, porque a pesar de que nada merezco Él me dado todo, por todas las oraciones que respondió y por todas las que no respondió. Por su inmenso y extravagante amor para conmigo, quien me atrajo a cumplir sus planes y me lleno de gozo y alegría. A Él, quien es mi Padre amoroso, mi pariente más cercano, quien le dio valor a mi vida, que me lleno de sueños y esperanza, quien se convirtió en mi camino, cuando no encontraba salida. Por venir conmigo y ser mi descanso y mi reposo, por ser Rey y quien me gobierna, por ser quien cuida mi sueño y mis pensamientos, por rescatarme del lodo y hacer mis pies firmes como de cierva de modo que me sostiene en las alturas.

Por ser mi consejero, y el amigo que me habla con verdad, amor y sinceridad, por ser el agua en las temporadas correctas, de modo que trae a vida lo que estaba muerto, por ser la luz de mi vida, la luz en mis tinieblas, por alumbrar mis ojos con el conocimiento, por ser la llama que se encendió y que arde continuamente, por la plenitud que me ha permitido experimentar, y por dejarme tomar de su gracia, por todo lo que me ha dado y por lo que aún no ha sido manifiesto, porque Él es fiel y verdadero. Por enviarme a personas que me han ayudado, que me han comprendido y me han dedicado su tiempo, por ser mi Padre y adoptarme en su familia.

A la familia que formare, la cual tiene nombre en la eternidad, por ser mi mayor inspiración, por ser la mejor revelación que he recibido, por ser quienes me vuelven al camino y no me dejan desviarme, por permitirme poder esperarlos con ansias pero sin desfallecer, por ser mi mayor sueño y una de las mejores recompensas, por la esperanza que producen en mí solo al pensar en ustedes, sin ustedes mi vida no sería igual, los amo entrañablemente.

A mis padres Orlando Regalado y Victoria Martínez, quienes desde mi infancia han contribuido en el crecimiento de mi ser, quienes creyeron en la promesa que Dios tenía para mi vida, por soltarme y apoyarme en este sueño, por dejarme volar, por su honestidad, por la fuerza de trabajo y dedicación en todo lo que hacen. Por inspirarme a ser cada día mejor, a buscar y seguir mis sueños. Por permitirme ser sin apariencias y aceptarme sin medida, sin juicios, y sin mascarar. Por el cuidado y la paciencia que desde niña me han brindado, por mantener los brazos siempre abiertos para mí, por ser el mayor regalo que Dios me ha dado. Por sus consejos, por su amor, por la felicidad que me han dado, mi más grandes agradecimientos y mi más

grande admiración.

A mis hermanos Diana, Andrea y Esteban, y mi cuñado Jair, por ser mis compañeros de vida, por quererme sin esperar nada a cambio, por el apoyo y las risas que hemos compartido, por ser mis amigos y mis confidentes, porque con ustedes puedo compartir mis sueños, gracias.

A mis sobrinos Yocelin, Daniel y Joao, por inspirarme a ser cada día mejor, por permitirme verlos crecer, por dejarme ver luz y propósito.

A mi orientador Jorge Ruiz por su paciencia, por la dedicación con la que me ha guiado en este trabajo, por la oportunidad de permitirme trabajar con él y transmitirme su conocimiento, por la tranquilidad que me imparte y por ser una persona que me inspira con su carrera y trabajo.

A Ruth Burgos por ser la amiga que nunca tuve, por permitirme ser amiga, por ser mi compañera en la universidad y en la vida, porque me ha permitido ser sin apariencias, por ser paciente y comprensiva, por ser buena amiga, por enseñarme y por permitirme crecer espiritualmente, por dejarme conocer una parte de Dios en ella.

A mis amigos Camila Escobar, Eliana Beltran y Santiago Marsiglia, quienes han sido mi compañía en esta ciudad, por hacerme madurar, por permitirme ayudarlos y por dejarme enseñarles e impartirles el conocimiento que poseo.

A Sara Lima mi compañera de lucha y batallas, por compartir conmigo el mismo esfuerzo, empeño y amor por esta profesión.

A Mathias, Daneliz, Yeltsin, Luiza, Elize, Midia, Marcos Vinicius, Sabrina, Camilo, mis hermanos en Cristo y con quienes he podido compartir la multiforme gracia de Dios, por enseñarme y hacerme crecer en fe.

Al Pastor Nelton y Franky Zamboto, por ser la autoridad en mi vida de parte de Dios en esta ciudad, por sus cuidados y por sus consejos, por guiarme a parecerme más a Cristo, por las palabras de vida que me han dado, y por ser un ejemplo de siervos.

Al Pastor Oseaz y Fabia, por permitirme hacer parte de la sexta Iglesia Cuadrangular, por permitirme crecer en ella y dar frutos, por creer en mí, aun cuando yo no creo, gracias por sus oraciones y su apoyo espiritual.

A la banca por aceptar mi invitación, y por su tiempo.

Así que si ustedes escuchan cuidadosamente a mis mitzvot que les estoy dando hoy, amar a YAHWEH su Elohim y servirle con todo su corazón y todo su ser;

Entonces Yo daré a su tierra la lluvia en las temporadas correctas, incluyendo la lluvia temprana de otoño y la lluvia tardía de primavera; para que recojan su trigo, vino nuevo, y aceite de oliva;

Deuteronomios 11:13-14
Biblia Kadosh Israelita Mesiánica

REGALADO MARTÍNEZ, Johana Esther. **EVALUACION DE LOS EFECTOS ANTITUMORALES DE *Genipa americana***. 2021. Número de páginas 41. Trabajo de Conclusión de Curso Biotecnología – Universidad Federal de la Integración de Latino-America, Foz de Iguazú, 2021.

RESUMEN

El cáncer es una patología dada por el crecimiento exacerbado de algunas células, que son expuestas a agentes carcinogénicos, lo que termina generando masas o tumores. El cáncer genera un fuerte impacto a nivel social, psicológico, físico y económico, afectando a la persona que lo padece y al sistema de salud pública. Por esta razón se buscan nuevas alternativas de tratamiento que disminuya los costos y sean más efectivos, una opción promisoriosa son los aceites esenciales de plantas medicinales, debido a que reúnen las diversas moléculas de las plantas, que han demostrado tener actividad biológica, ya que son liposolubles, permitiendo que tengan un efecto sobre las células. La *G. americana* o conocida comúnmente como “Jenipapo” es una planta encontrada en América Central y América del Sur, y el aceite esencial que se consigue de esta planta presenta alto contenido de compuestos, que han comprobado tener actividad farmacológica, anti angiogénica, antitumoral y antioxidante, que inducen la apoptosis o la muerte de células tumorales. Por ello este trabajo busca comprobar el efecto que tiene una muestra de aceite esencial de jenipapo sobre las células tumorales específicamente las células A549 (carcinoma pulmonar, ATCC CCL-185), Para ello se descongeló y cultivó los linajes celulares A549, U-87 (astrocitoma de glioblastoma humano, ATCC HTB-14™) y Mia-Paca 2 (carcinoma pancreático, ATCC CRL-1420) en frascos para cultivo celular de 75 cm², con Medio Esencial Mínimo (DMEM) que contenía 10% de penicilina y estreptomina, y 10% de suero fetal bovino (SFB), se dejaron crecer en la estufa a 37 °C, con CO₂, supervisando el crecimiento cada 3 días. Se hizo tinción de fluorescencia usando DAPI, para determinar si había contaminación, se hizo pruebas de viabilidad celular por conteo celular y MTT para evaluar la capacidad citotóxica del aceite esencial de jenipapo sobre las células, y los datos obtenidos se analizaron usando *GraphPad Prism 5* ®. A pesar de que se buscó usar los tres linajes celulares, esto no fue posible, y solo se obtuvo resultados para las células A549, y se determinó que el IC₅₀ del aceite esenciales de *G. americana* sobre las células A549 es de 0.5026 v/v, lo cual puede estar asociado a los tipos de hexanol, hexanal, hidroxitolueno butilado y benzoato de hexilo, encontrados en la muestra de aceite que se usó.

Palabras claves: Aceite esencial, *G. americana*, Tumor, Linajes celulares, Antitumoral

REGALADO MARTÍNEZ, Johana Esther. **EVALUATION OF THE ANTITUMORAL EFFECTS OF *Genipa americana***. 2021. Number of pages 41. Completion of the Biotechnology Course - Federal University of Latin-American Integration, Foz de Iguazú, 2021.

ABSTRACT

Cancer is a pathology caused by the exacerbated growth of some cells, which are exposed to carcinogenic agents, this ends up generating masses or tumors. Cancer generates a strong impact on a social, psychological, physical and economic level, affecting the person who suffers it and the public health system. For this reason, new treatment alternatives are sought that reduce costs and are more effective, a promising option is the essential oils of medicinal plants, because they bring together the various molecules of plants, which have been shown to have biological activity, since they are Fat-soluble, allowing them to have an effect on cells. The *G. americana* or commonly known as "Jenipapo" is a plant found in Central and South America, and the essential oil obtained from this plant has a high content of compounds, which have been shown to have pharmacological, anti-angiogenic, antitumor and antioxidant activity. , what induces apoptosis or tumor cell death. For this reason, this work seeks to verify the effect of a sample of jenipapo essential oil on tumor cells, specifically A549 cells (lung tumor cells). To do this, the A549, U-87 (glioblastoma cells) and Mia-Paca 2 (pancreatic cancer cells) cell lines were thawed and cultured in 75 cm² cell culture flasks, with Minimum Essential Medium (DMEM) containing 10% penicillin and streptomycin, and 10% fetal bovine serum (FBS), the cells were allowed to grow in the oven at 37 °C, with CO₂, monitoring the growth every 3 days. Fluorescence staining was done using DAPI, to determine if there was contamination, cell viability tests were performed by cell count and MTT to evaluate the cytotoxic capacity of the essential oil of jenipapo on the cells, and the data obtained were analyzed using GraphPad Prism 5®. Although it was sought to use the three cell lines, this was not possible, and results were only obtained for A549 cells, and it was determined that the IC₅₀ of *G. americana* essential oil on A549 cells is 0.5026 v/v, which may be associated with the types of hexanol, hexanal, butylated hydroxytoluene and hexyl benzoate, found in the oil sample that was used.

Keywords: Essential oil, *G. americana*, Tumor, Cell lines, Antitumor

REGALADO MARTÍNEZ, Johana Esther. **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS DE *Genipa americana***. 2021. Número de páginas 41. Trabalho de conclusão do Curso de Biotecnologia - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz de Iguaçu, 2021.

RESUMO

O câncer é uma patologia causada pelo crescimento exacerbado de algumas células, que ficam expostas a agentes carcinogênicos, o que acaba gerando massas ou tumores. O câncer gera forte impacto a nível social, psicológico, físico e econômico, afetando a pessoa que o sofre e o sistema público de saúde. Por esse motivo, buscam-se novas alternativas de tratamento que reduzam custos e sejam mais eficazes, uma opção promissora são os óleos essenciais de plantas medicinais, pois reúnem as diversas moléculas das plantas, que já demonstraram ter atividade biológica, uma vez que são lipossolúveis, permitindo que tenham efeito nas células. A *G. americana* ou vulgarmente conhecida como “Jenipapo” é uma planta encontrada na América Central e do Sul, e o óleo essencial obtido desta planta possui um elevado teor de compostos, os quais demonstraram ter atividade farmacológica, antiangiogênica, antitumoral e antioxidante, o que induz apoptose ou morte de células tumorais. Por esse motivo, este trabalho visa verificar o efeito de uma amostra do óleo essencial de jenipapo sobre células tumorais, especificamente as células A549 (células tumorais de pulmão). Para fazer isso, as linhas celulares A549, U-87 (astrocitoma de glioblastoma humano, ATCC HTB-14™) e Mia-Paca 2 (carcinoma pancreático, ATCC CRL-1420) foram descongeladas e cultivadas em frascos de cultura de células de 75 cm², com Meio Essencial Mínimo (DMEM) contendo 10% de penicilina e estreptomicina, e 10% de Soro fetal bovino (SFB), foram cultivados em estufa a 37 °C, com CO₂, monitorando o crescimento a cada 3 dias. A coloração por fluorescência foi feita com DAPI, para determinar se havia contaminação, testes de viabilidade celular foram feitos por contagem de células e MTT para avaliar a capacidade citotóxica do óleo essencial de jenipapo nas células, e os dados obtidos foram analisados usando GraphPad Prism 5®. Embora se tenha procurado usar as três linhas celulares, isso não foi possível, e os resultados foram obtidos apenas para células A549, e foi determinado que o IC50 do óleo essencial de *G. americana* em células A549 é 0,5026 v / v, o que pode ser associado aos tipos de hexanol, hexanal, hidroxitolueno butilado e benzoato de hexila, encontrados na amostra de óleo utilizada.

Palavras-chave: Óleo essencial, *G. americana*, Tumor, Linhas celulares, Antitumorais

LISTA DE IMAGENES

Imagen 1 – Etapas del Cáncer	03
Imagen 2 – Hojas <i>Genipa americana L.</i>	08
Imagen 3 – Microscopia óptica de células U-87, 4x (A), 40x (B)	15
Imagen 4 – Microscopia de fluorescencia de células U-87, 20x (A), 40x (B).....	16
Imagen 5 – Microscopia óptica de células A549, 4x (A), 10x (B), 40x (C).....	17
Imagen 6 – Microscopia de fluorescencia de células A549, 20x (A), 40x (B).....	17
Imagen 7 – Viabilidad celular A549.....	19
Imagen 8 – Contaminación por hongo	21

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

A549	Linaje celular carcinoma pulmonar, ATCC CCL-185
ADN	Ácido desoxirribonucleico
antifade	<i>ProLong™ Gold Antifade Mountant</i>
cm ²	centímetro cuadrado
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DE	Desvió patrón
DMEN	Medio esencial mínimo
DMSO	Dimetilsulfoxido
<i>G. americana</i>	<i>Genipa americana</i>
ILACVN	Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza
h	Hora
IC50	Concentración inhibidora del 50%
Jenipapo	Nombre común de la <i>Genipa americana</i>
Mia-Paca 2	Linaje celular carcinoma pancreático, ATCC CRL-1420
min	Minutos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
nm	Nanómetro
CO ₂	Dióxido de carbono
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PBT	Impermeabilizante
PF	Solución de fijación, paraformaldehído 4%, y PBS
rpm	Revolución por minuto
SFB	Suero fetal bovino
SUS	Sistema Unificado de Salud
U-87	Linaje celular astrocitoma de glioblastoma humano, ATCC HTB-14™
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
v/v	Concentración volumen /volumen

SUMARIO

1. INTRODUCCION Y JUSTIFICACION	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. CANCER	3
2.1.1. Glioblastoma Humano	4
2.1.2. Carcinoma Pancreático	5
2.1.3. Tumor de pulmón.....	6
2.2. PLANTAS MEDICINALES	6
2.2.1. Aceites Esenciales.....	7
2.2.2. Jenipapo - <i>Genipa americana</i>	8
2.2.3. Aceite esencial de <i>G. americana</i>	9
3. OBJETIVOS.....	10
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	10
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
4. METODOLOGIA	11
4.1. ACEITE ESENCIAL DE JENIPAPO	11
4.2. DESCONGELAMIENTO Y CULTIVO CELULAR	11
4.3. CONTEO CELULAR CON AZUL DE TRIPANO.....	11
4.4. TINCION DE FLUORESCENCIA CON DAPI	12
4.3. PRUEBAS DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....	13
4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
5.1. CÉLULAS Mia-Paca 2	15
5.2. TINCIÓN DE FLUORESCENCIA U-87 CON DAPI	15
5.3. CÉLULAS A549.....	17
5.3.1. Tinción de fluorescencia A549 con DAPI.....	17
5.3.2. Viabilidad celular de A549	18

5.4.	CONTAMINACIÓN CELULAR.....	20
6.	CONCLUSIONES	22
7.	REFERENCIAS	23
8.	ANEXOS	26
8.1	ANEXO 1.....	26

1. INTRODUCCION Y JUSTIFICACION

El cáncer es una patología que se ha descrito desde la antigüedad y que se caracteriza por un crecimiento exacerbado de las células (INCA, 2011). Las células pasan por diferentes etapas hasta desarrollar el cáncer, este proceso comienza desde el momento en que las células son expuestas a un agente carcinógeno. Si el agente carcinogénico está en la medida efectiva puede generar alteraciones celulares y genéticas, las células alteradas comienzan a reproducirse y generar masas o tumores (Políticas Públicas de Salud 2006).

Los tumores pueden ser malignos o benignos en el caso de los benignos son menos peligrosos y aunque pueden invadir tejidos vecinos no se diseminan en todo el organismo por lo que pueden ser retirados. En el caso de los tumores malignos son mucho más agresivos, ya que las células alteradas pueden llegar invadir a todo el cuerpo proceso denominado metástasis (INCA, 2011).

El nombre del cáncer depende del lugar del cuerpo que aparece y del tipo de tumor si es benigno o maligno. En Brasil se tiene que entre los cánceres más comunes y a nivel mundial está el tumor de pulmón asociado al consumo del tabaco en el 80% al 90% de los casos (KEITH, R. 2018: ARAUJO, L. *et al.* 2018), y presenta 1,6 millones de casos nuevos y 1,4 millones de óbito (INCA, 2010).

Otros cánceres con menor incidencia son el cáncer pancreático que lo padece el 2% de la población brasileña, con un 4% de óbitos del total de casos de cáncer (DREYER, S. *et al.*, 2021; INCA, 2021). Y el cáncer cerebral maligno o glioblastoma con un porcentaje que va de 1.2 a 1.6% de pacientes de cáncer que lo padecen a nivel mundial, en Brasil causa el 4% de las muertes por cáncer en 2020 (INCA, 2020).

El cáncer afecta en todas las áreas a las personas que lo padecen, entre ellas está lo social, lo psicológico, lo físico y lo económico, este último tiene un impacto muy significativo no solamente en la persona, sino también en el sistema de salud público debido a que genera grandes costos, tanto en tratamiento como en los servicios médicos, que no garantizan un alivio considerable en los pacientes (ERTHAL, R. *et al.* 2017).

Es por ello que se deben buscar nuevas alternativas de tratamiento que disminuyen los costos y sean más efectivo. Las plantas son reservorios de diversas moléculas que aún no se han estudiado, estas han sido utilizadas por siglos en

diferentes formas para el alivio y tratamiento de enfermedades (ACEVEDO, C. *et. al.*, 2018). Para poder extraer las moléculas con actividad biológica de la planta se ha utilizado diversas técnicas una de ellas es la extracción por medio de aceites esenciales (CORTIÑAS, A. 2005).

Los aceites esenciales son liposolubles lo que les permite que puedan atravesar las membranas biológicas, son levemente amarillos, con un olor fuerte y una densidad inferior a la del agua (CORTIÑAS, A. 2005).

En diferentes experimentos se ha podido evidenciar que los aceites esenciales tienen efectos antiinflamatorios y cicatrizantes en pacientes con cáncer, además han probado inducir a la apoptosis de células cancerígenas, el bloqueo del ciclo celular, el bloqueo de la angiogénesis y el bloqueo de la reparación del ADN, todo esto disminuye las células cancerígenas, la metástasis y la resistencia a medicamentos (PAEZ, G. *et. al.* 2019).

Una planta muy conocida en Brasil, en el centro y sur de América, es la *Genipa americana* conocida comúnmente como “jenipapo” que crece en suelos húmedos con gran contenido de agua (RAMALHO, P. 2003; BARBOSA, D. 2008), de esta planta se han extraído diferentes compuestos que han tenido acción farmacológica como su actividad antiangiogénica, antitumoral y antioxidante (BARBOSA, D. 2008).

Específicamente de la hoja de la planta, ya se han extraído aceites esenciales y los principales compuestos que se han encontrado son los iridóides, los cuales han demostrado tener acción antiviral, antimicrobiana, antitumoral, hemodinámica, vasoconstrictora, hepatoprotectora y antiinflamatoria (GOMES, S. *et. al.* 2011).

Por lo tanto el siguiente trabajo muestra los resultados de la evaluación y análisis *in vitro* de las capacidades antitumorales del aceite esencial de *Genipa americana L.*, en células tumorales A549 (carcinoma pulmonar, ATCC CCL-185), aunque se buscó medir su efecto en otras células como U-87 (astrocitoma de glioblastoma humano, ATCC HTB-14™), y Mia-Paca 2 (carcinoma pancreático, ATCC CRL-1420).

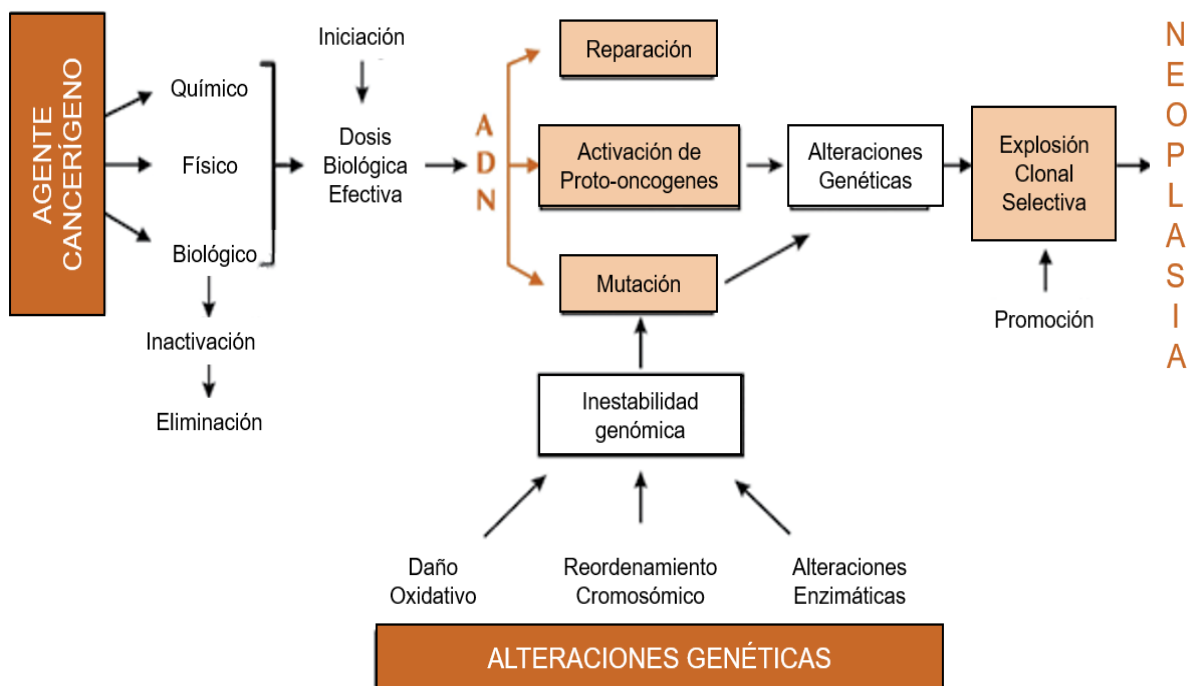
2. MARCO TEÓRICO

2.1. CANCER

El término cáncer es conocido y descrito desde la antigüedad por Hipócrates 400 años a.C. y hace referencia al resultado del crecimiento desordenado de células, diferenciándose de las células normales, debido a que éstas no mueren y tienen un crecimiento incontrolado que forma nuevas células anormales (INCA, 2011).

Para que el cáncer se desarrolle pasa por diferentes estadios, que comienza con la exposición de células sanas a agentes oncogénicos que pueden ser físicos, biológicos o químicos, los cuales pueden modificar el ADN provocando alteraciones celulares y genéticas, y que cuando las células con estas alteraciones se dividen se traducen en anomalías neoplásicas, como lo muestra la imagen 1 (POLÍTICAS PÚBLICAS DE SAÚDE, 2006.).

Imagen 1. Etapas del Cáncer.



Fuente: Adaptación por Johana Regalado de INCA, 2011 (pág. 58)

Nota. La imagen describe el desarrollo de una neoplasia, desde que células son expuestas a un agente cancerígeno hasta formar un tumor. Esta es una adaptación del portugués al español.

El crecimiento descontrolado de células anormales hace que se formen

grupos de células o masas de tejido anormal, que tiene dependiendo de los casos una cierta autonomía, y que forman nuevos vasos sanguíneos que le permiten su nutrición proceso denominado angiogénesis, esta masa es denominada neoplasia o tumor, que pueden ser malignas o benignas (INCA, 2011).

En el primer caso, las neoplasias o tumores benignos contiene células mayormente diferenciadas, el crecimiento no es tan exponencial y aunque puede invadir tejidos vecinos, no llega a diseminarse por todo el organismo, lo que permite un mayor control de la enfermedad (INCA, 2011).

En el caso de los tumores malignos estos tienden a tener células poco diferenciadas que pueden dar origen a varios tipos celulares, su crecimiento es exponencial, además pueden llegar a invadir otras partes del cuerpo proceso denominado metástasis (INCA, 2011).

Pacientes que padecen cáncer incurren en muchos gastos que giran alrededor de medicamentos, consultas médicas, protocolos de servicios, procedimientos, tratamientos, exámenes de laboratorio e imágenes, transfusión sanguínea e internación hospitalaria, además de costos indirectos por el debilitamiento, que hace que la persona afectada no pueda trabajar influyendo en sus años de vida laborables y del tiempo que familiares invierte en sus cuidados (ERTHAL, R. *et. al.* 2017).

Según se ha estimado que un paciente con cáncer por un día de internalización, puede costar entre \$4.622,56 y 18.027,00 reales al Sistema Unificado de Salud (SUS) en Brasil, lo que hace necesario la creación de nuevos tratamientos más eficaces para el cáncer, que puedan impactar estos números (ERTHAL, R. *et. al.* 2017).

Los diferentes tipos de cáncer son nombrados generalmente por el lugar del cuerpo en donde aparecen, lo que hace que cada cáncer adquiera características de crecimiento, desarrolló y morfología diferentes. Es por ello que a continuación se muestra el desarrollo y la caracterización del glioblastoma humano, cáncer de páncreas y tumor de pulmón (POLÍTICAS PÚBLICAS DE SAÚDE, 2006.).

2.1.1. Glioblastoma Humano

El glioblastoma humano es un tipo de cáncer cerebral maligno, que puede localizarse en el hemisferio cerebral, el encéfalo o la médula espinal, esta ubicación

hace que sea complicado detectarlo a tiempo, para poder tratarlo lo más temprano posible, además que es un lugar de difícil acceso por lo que el proceso de extracción se torna un reto (YEINI, E. *et.al.* 2021; CARVALHO B. *et al.*, 2021)

El glioblastoma afecta de 1.2 a 1.6% de pacientes de cáncer que lo padecen a nivel mundial, en Brasil causa el 4% de las muertes por cáncer, para 2020 se esperaba 11.100 nuevos casos de glioblastoma (INCA, 2020).

Se cree que el apareamiento de glioblastomas está relacionado con factores genéticos, ambientales y hormonales, que inducen la transformación de células sanas en células cancerígenas (YEINI, E. *et.al.* 2021).

Factores ambientales como la exposición a agentes carcinogénicos, como derivados del petróleo, el aumento de la edad de vida junto con los malos hábitos de vida y alimenticios, son tenidos en cuenta. Factores genéticos como mutación en los proto-oncogenes y en el ciclo genético celular, y en la inactivación de genes supresores de tumor (CARVALHO B. *et al.*, 2021).

2.1.2. Carcinoma Pancreático

El carcinoma pancreático se presenta en el páncreas y existe una baja incidencia a nivel mundial, siendo el 1% de los pacientes con cáncer que lo padecen, este está presente generalmente en personas mayores de cuarenta años. Se conoce como la neoplasia maligna del tracto digestivo más letal, debido al número de muertes que este cáncer ocasiona por año y la rapidez con la que se propaga (DREYER, S. *et. al.* 2021).

Entre los factores de riesgo están: la edad (>40 años), ser de raza negra, sexo masculino, ser consumidor de tabaco, presentar obesidad o diabetes mellitus y en menos del 10% de los casos se relacionan a factores genéticos (DREYER, S. *et. al.* 2021).

En el cáncer de páncreas se manifiesta un alto grado de estrés en la replicación, impulsada por la activación oncogénica y una deficiente respuesta en el daño del ADN, esto hace que el ADN sea sensible a agentes que dañan el ADN (DREYER, S. *et. al.* 2021).

El cáncer pancreático es un tumor sólido rodeado de un estroma fibrótico que constituye más del 80% de la masa tumoral, creando una barrera que le permite estar protegido a la acción de fármacos. El estroma es producido por células

estrelladas pancreáticas asociadas al cáncer, que son activadas y reclutadas por las células del cáncer pancreático, lo que aumenta la agresividad de este tipo de cáncer (KOKKINOS, J. et al. 2020).

2.1.3. Tumor de pulmón

El tumor de pulmón es un tumor maligno que tiene alta incidencia y tasa de mortalidad, y es la enfermedad maligna más común en el mundo. En Brasil representa el segundo cáncer más común, el 13% de los nuevos casos de cáncer, son asociados a cáncer de pulmón (INCA, 2021).

Los factores relacionados al cáncer de pulmón, como el consumo de tabaco del 80 al 90% de los casos, a fumadores pasivos, y a exposición a ambientes contaminados, que causan múltiples mutaciones en las células antes que se tornen neoplásicas. El cáncer de pulmón se clasifica en cáncer de pulmón de células pequeñas (15% de los casos) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (85% de los casos) (KEITH, R. 2018: ARAUJO, L. et al. 2018).

2.2. PLANTAS MEDICINALES

Las plantas medicinales se usan desde la antigüedad para el tratamiento de diversas enfermedades y en ellas se ha descubierto una variedad de moléculas y compuestos que se usan para el alivio y tratamiento de enfermedades (AZEVEDO, C. et al. 2018).

Existe una gran variedad de sustancias producidas por plantas que tienen efecto en el organismo humano, y que pueden actuar en algunas rutas metabólicas, como hormonas, antioxidantes, etc. Estas sustancias se pueden encontrar en partes de la planta como hojas, raíz, tallo, cascara, flores, frutos y semillas, y se pueden extraer por diferentes técnicas (AZEVEDO, C. et al. 2018).

Entre las clases de sustancias químicas se encuentran mucilagos, fenoles, taninos, flavonoides, cumarinas, iridoides, aceites esenciales, terpenoides, saponinas, alcaloides, sustancias con azufre, proteínas y lectinas, ácidos grasos (omega 3-6-9), vitaminas, carotenoides, minerales y varios otros metabolitos (AZEVEDO, C. et al. 2018).

La concentración de cada una de las sustancias mencionadas, va a

depender del género, la especie, la edad de la planta, el lugar, las estaciones, las condiciones de crecimiento y cultivo a las que la planta fue expuesta (AZEVEDO, C. *et. al.* 2018).

Entonces se puede decir que el extraer nuevas moléculas de las plantas con potencial en el tratamientos de diversas enfermedades y considerando que se ha demostrado la acción de extractos de plantas y aceites esenciales en el tratamiento de cáncer, con efectos antiinflamatorios, anticancerígenos, antioxidantes, antimutagénicos y cicatrizante (AZEVEDO, C. *et. al.* 2018).

Por ello las plantas medicinales se tornan una opción para descubrir y estudiar nuevos compuestos que sean más eficaces, con mejor rendimiento y a un menor costo que traten el cáncer.

2.2.1. Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son sustancias extraídas de las plantas y representan una pequeña proporción de la composición de la planta, y se pueden extraer de ciertos órganos de la planta como hojas, raíz, tallo, cascara, flores, frutos y semillas (CORTIÑAS, A. 2005).

Por ello pueden ser recuperados por diferentes métodos como arrastre de evaporación, destilación seca o por procedimientos mecánicos, entre otros, con los cuales se consigue una mezcla acuosa, de esta mezcla se separara el aceite esencial por aireación, re- destilación o por otros métodos, el resultado es un aceite esencial rico en moléculas de las plantas (CORTIÑAS, A. 2005).

Los aceites esenciales se destacan por ser liposolubles o poco solubles en agua, importante para la absorción de estas sustancias en los sistemas vivos su paso por las membranas biológicas, son líquidos, casi incoloros o levemente amarillos, tiene un olor fuerte y su densidad es inferior a la del agua (CORTIÑAS, A. 2005).

Entre las sustancias que se pueden encontrar en los aceites esenciales están los terpenos y terpenoides, aromáticos (fenólicos) y compuestos alifáticos (alcanos y alquenos), todos ellos con bajo peso molecular (CORTIÑAS, A. 2005).

Entre los compuestos que se ha comprobado efecto anticancerígeno tanto *in vivo* como *in vitro* están los alcaloides, saponinas, triterpenos, glucósidos y polifenoles. La mayoría de estos compuestos son bien tolerados en pacientes, sin la aparición de efectos tóxicos aun en dosis elevadas (CORTIÑAS, A. 2005).

Se ha demostrado que los aceites esenciales tienen un efecto anticancerígeno que puede ser quimiopreventivo o como supresor en el tratamiento de cáncer, además de actuar como antiinflamatorios y cicatrizantes en paciente con cáncer (PAEZ, G. *et. al.* 2019).

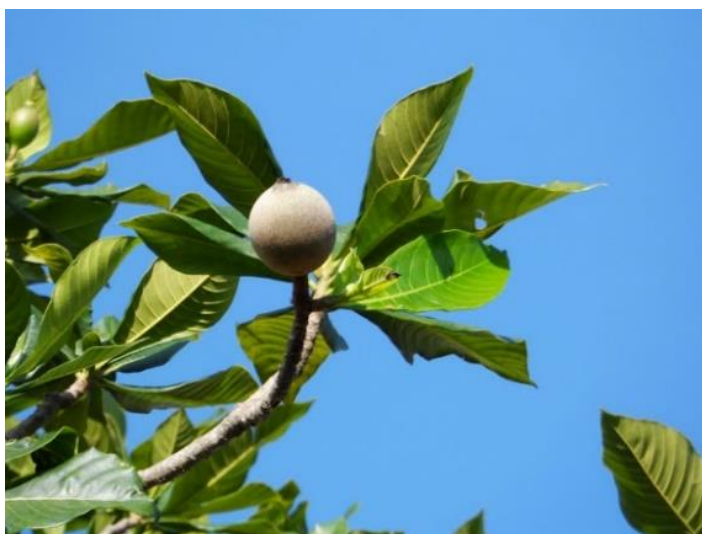
Entre los mecanismos que utilizan los aceites esenciales contra las células cancerígenas están la inducción a apoptosis o muerte celular, el aumento de niveles de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, la detención del ciclo celular, anti-angiogénesis y la reparación del ADN. Esto disminuye el crecimiento de células cancerígenas, la metástasis y la resistencia a medicamentos (PAEZ, G. *et. al.* 2019).

2.2.2. Jenipapo - *Genipa americana*

La *Genipa americana* conocida comúnmente como “jenipapo” es una planta, que en tupi-guarini significa “fruto que sirve para pintar”, es semejante a la *Gardenia genipa Swartz*, se adapta a diferentes tipos de temperatura, pero que está mejor en climas tropicales sin restricción a altas temperaturas (RAMALHO, P. 2003).

Esta planta puede ser encontrada a lo largo de toda América Central tropical y América del Sur preferentemente en suelos húmedos con gran contenido de agua. Se han encontrado en el Jenipapo diferentes compuestos que pueden ser utilizados como la madera, los frutos que son comestibles y las hojas en dónde pueden encontrarse diferentes moléculas (BARBOSA, D. 2008).

Imagen 2. Hojas *Genipa americana* L.



Fuente: A planta da vez, 2015.

Nota. La imagen muestra la planta de jenipapo, sus hojas y su fruto, asociado a que el árbol ya está maduro.

La hojas son opuestas, glabras, estrechas en la bases y de 10 a 35 cm de largo, por ello son muy fácil de distinguir a simple vista, como se puede ver en la Imagen 2 y de ella se ha podido extraer aceite esencial con varias moléculas que han demostrado tener acción farmacológica como anti-angiogenica, antitumoral y antioxidante (BARBOSA, D. 2008).

2.2.3. Aceite esencial de *G. americana*

En otros estudios ya se ha extraído el aceite esencial de *G. americana* y entre los compuestos extraídos de esta especie que más se han encontrado están los iridóides que son monoterpenos producidos por metabolismo secundario de la planta, que al ser consumido por humanos han demostrado tener acción antiviral, antimicrobiana, antitumoral, hemodinámica, vasoconstrictora, hepatoprotectora y antiinflamatoria (GOMES, S. *et. al.* 2011).

Entre los iridóides hay uno característico que es extraído de las hojas que es el iridoide glicosilado o ácido geniposídico, que ha tenido efecto comprobado como antidiabético porque inhibe la enzima α -glucosidasa y antihelmíntico sobre todo en el estado larvario. Además los iridóides son moléculas precursoras de alcaloides indol monoterpenoides, como la vincristina y la vinblastina, que se usan en el tratamiento del cáncer (FERREIRA, J. 2014; ALVES, J. 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar las capacidades antitumorales del Jenipapo (*Genipa americana*) utilizando un modelo experimental de células humanas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar científicamente el aceite esencial de *Genipa americana* para tratamiento terapéutico;
- Verificar la eficacia antitumoral del aceite esencial de *Genipa americana* a nivel celular.

4. METODOLOGIA

4.1. ACEITE ESENCIAL DE JENIPAPO

La extracción del aceite esencial de la *G. americana* fue hecha por medio de destilación en un aparato clevenger, esta extracción no la realizó el autor, sino que fue cedida por la profesora Jociani Ascari da Universidad Tecnológica Federal de Paraná, además ella también aportó la cromatografía que muestra la caracterización de moléculas contenidas en el aceite y que se encuentra en el ANEXO 1 de este documento.

4.2. DESCONGELAMIENTO Y CULTIVO CELULAR

El tubo de crio preservación que se encontraba en el frízer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se llevó a la capela y se descongeló rápidamente para no causar daño celular. Después el contenido se transfirió a un tubo cónico con 10 ml de DMEN (*Minimal Essential Medium*), el tubo se centrifugó por 10 min a 800 rpm a temperatura ambiente (Ramos, J. 2020).

Después en la capela se descartó el sobrenadante y se re suspendió el contenido en 10 ml de medio, esto se colocó en una jarra y se cultivó como se indica a continuación.

En laboratorio se cultivaron los linajes celulares U-87, Mia-Paca 2 y A549 en frascos para cultivo celular de 75 cm^2 , después se colocó en las células U-87, A549 y en las Mia-Capa 2 medio DMEN.

En los tres casos el medio se suplementó con 1% de penicilina y estreptomina (Sigma-Aldrich®, EE. UU.), con el fin de evitar la contaminación, y suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Gibco, Brasil) para inducir el crecimiento y la adhesión celular. Se dejó el frasco en la estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con suministro de CO_2 , y se supervisó el crecimiento cada 3 días.

4.3. CONTEO CELULAR CON AZUL DE TRIPANO

Después que los linajes celulares U-87 y A549 cultivados crecieron, se

llevaron a la capela y se les descartó el medio, se lavaron dos veces con 3 ml de PBS por 3 min, se descartó el PBS.

Después se colocó 4 ml de Tripsina se dejó por 4 min en la estufa hasta que se despegaran del frasco, luego se colocó 4 ml de medio, se resuspendió y se trasladó todo a un tubo con tapa de 15 ml, se centrifugo por 10 min a 1.000 rpm, se descartó el líquido y el precipitado se resuspendió en 1 ml de medio, esto se trasladó a un eppendorf.

En seguida con una pipeta se tomó 10 μ l del eppendorf y se lo mezcló con 10 μ l de azul de tripan, después se colocó en la cámara de Neubauer y se contó las células, diferenciando las células vivas de las muertas (color azul), y se encontró la viabilidad celular que mayor al 90%, con esta medida se hizo el cálculo para obtener la concentración deseada.

4.4. TINCION DE FLUORESCENCIA CON DAPI

Después de hacer el paso 4.3., se consiguió la concentración celular de 5×10^5 en 2 ml. En la capela se utilizó, una placa de Petri de 3.5 cm² de área previamente esterilizada, se colocaron 3 laminulas también esterilizadas, sobre las cuales se colocaron los 2 ml del medio con las concentración celular obtenida, se dejaron crecer en la estufa a 37°C con suministro de CO₂, durante un día.

Después se observó en la placa la adherencia celular con el microscopio invertido, se llevó a capela y se descartó el medio, en seguida se agregó PF (solución de fijación, paraformaldehído 4%, y PBS) de modo que cubriera las laminulas, se encubo en la estufa por 20 min. Después se removió el PF y se adiciono PBT (impermeabilizante) y se dejó por 5 min a temperatura ambiente, este paso se repitió por tres veces.

En seguida con poca luz se removió el PBT y se colocó la 10 μ l de solución DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), se dejó en la nevera toda la noche. Después se retiró el DAPI y se lavó las laminulas con PBT tres veces, y se enjuago dos veces con PBS.

En seguida se retiró las laminulas de la Placa de Petri con pinzas, se las dejo secar en papel, cuidando la orientación en donde estaban las células, en una lámina se colocó una gota de antifade (*ProLong™ Gold Antifade Mountant*), se tomó la laminula seca con pinzas, y se colocó de modo que la cara donde estaban las

células hacia contacto con la gota, se hizo presión para esparcir todo el antifade en la laminula, se selló los bordes de la laminula con esmalte y se llevó al microscopio de fluorescencia para ver el resultado.

4.5. PRUEBAS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

El extracto del aceite esencial de *G. americana* se probó en el linaje celular A549. Para determinar el efecto sobre la viabilidad celular, se realizó una selección inicial aplicando el ensayo de reducción de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), en donde las células que se cultivaron en medio DMEM, se sembraron en placas de 96 pocillos (Corning, EE. UU.).

Después de aplicar el punto 4.3, se ajustó la concentración y en cada pocillo se colocó 50 μ l de medio DMEM con concentración de 1×10^4 células, y se dejó por 12 horas para que las células se fijaran, en la estufa.

Después a cada pocillo se agregó 50 μ l de diluciones seriadas del aceite esencial de *G. americana*, con concentraciones que fueron desde 1,0 % a 0,0078% v/v, para el control positivo se usó solo medio y para el control negativo se usó DMCO al 20%. Cada concentración se probó seis veces y se dejó 24 horas haciendo que el aceite esencial reaccionara en las células.

Luego se agregaron 10 μ L de MTT en cada pocillo y después de 4 h, se determinó la viabilidad celular cuantificando la absorbancia a 570 nm y 630 nm en un espectrofotómetro (Spectramax Paradigm, Molecular Devices, EE. UU.).

Los datos obtenidos de absorbancia se transformaron en el porcentaje de viabilidad celular utilizando como referencia los controles sin tratar y se realizó una curva de viabilidad celular en función de la concentración. Normalizando los datos y aplicando regresión no lineal, se determinó la concentración inhibidora del 50% (IC50).

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para comprobar las diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de las células cancerosas y de control, se usó análisis de varianza de la muestra: ANOVA de una vía y ANOVA de dos vías, con múltiples comparaciones de Bonferroni utilizando el paquete estadístico *GraphPad Prism 5*®. Los resultados se

expresaron como media \pm DE de seis experimentos diferentes realizados por sextuplicado considerando un valor estadísticamente significativo de $p < 0,05$. (LEVY, M. *et al.* 2017).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

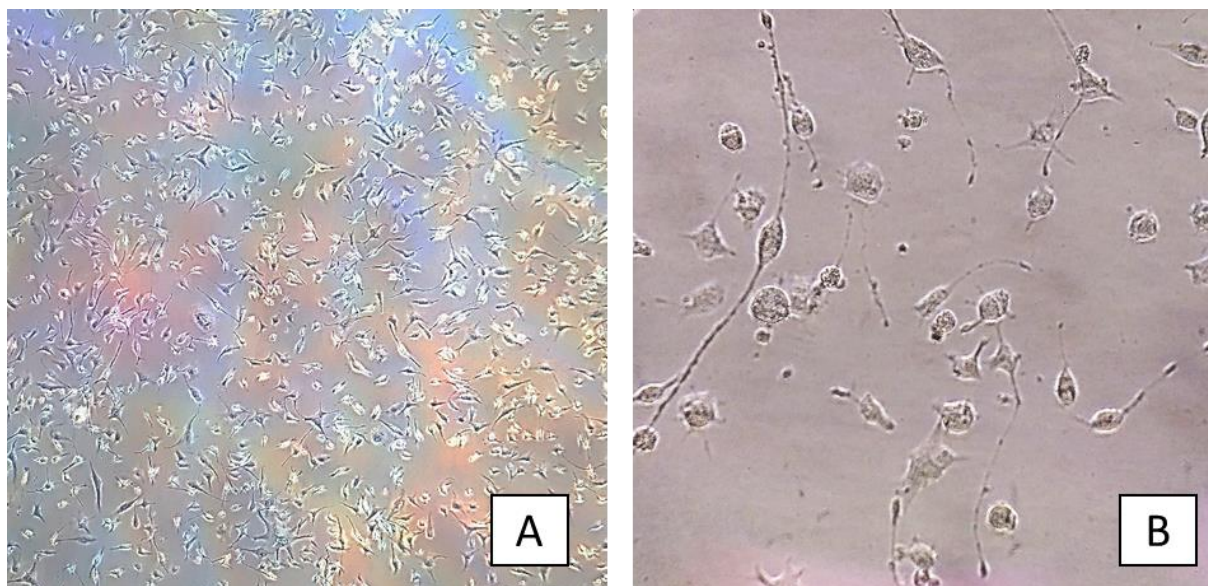
5.1. CÉLULAS Mia-Paca 2

Las células Mia-Paca 2 que se tenían en laboratorio al ser descongeladas no crecieron, por lo que no se consiguió continuar con los experimentos con este linaje. Debido a la capacidad proliferativa, siendo que después de algunos días no se observó adherencia de células por lo que se descartó la jarra.

Esto puede suceder por diversos motivos entre ellos esta una baja concentración celular de la muestra, un reactivo que se utiliza para crio preservar las células es el DMSO (dimetilsulfoxido) que es toxico para las células, la falta de experticia para manipular las células, entre otras.

5.2. TINCIÓN DE FLUORESCENCIA U-87 CON DAPI

Imagen 3. Microscopia óptica de células U-87, 4x (A), 40x (B).



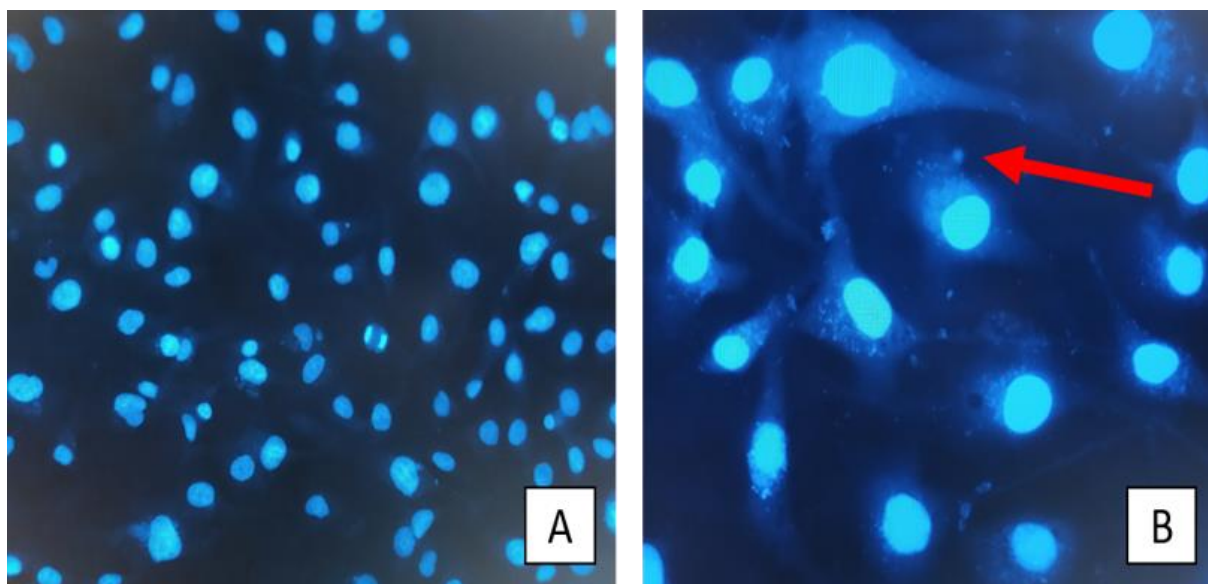
Fuente: Johana Regalado, 2021.

Nota. La imagen muestra las células U-87 con microscopia óptica; (A) con aumento 4x y una confluencia mayor del 90% de las células U-87; (B) con aumento de 40x donde se nota la morfología celular.

Las células U-87 crecieron, como se observa en la Imagen 3 y se pudo obtener una cantidad considerable de ellas, sin embargo se hizo una prueba de fluorescencia para detectar si había contaminación en el linaje, y por medio de la coloración con DAPI se pudo determinar que el linaje estaba contaminado.

El DAPI es utilizado como fluoroforo que marca las regiones ricas de adenina y timina del ADN, que se encuentra en el núcleo, con todo la imagen del microscopio mostro la coloración del núcleo y unos puntos alrededor de él, repartidos en el citoplasma como muestra la imagen 4, que indican que hay ADN en toda la célula, lo que indica la existencia de contaminación.

Imagen 4. Microscopia de fluorescencia de células U-87, 20x (A), 40x (B).



Fuente: Johana Regalado, 2021.

Nota. La imagen muestra las células U-87 con microscopia de fluorescencia; (A) con aumento 20x; (B) con aumento de 40x donde la flecha destaca la contaminación por micoplasma.

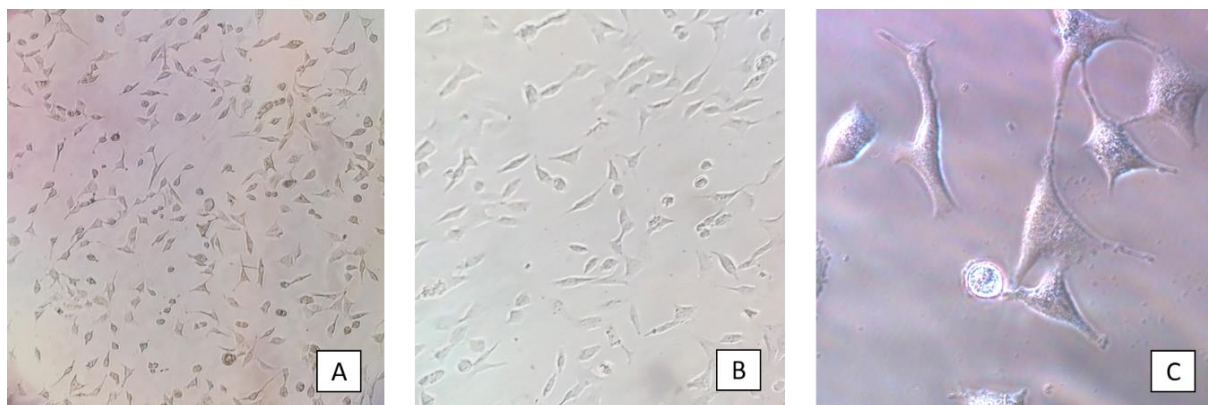
La Imagen 4 revela la presencia de micoplasma, este tipo de contaminación es muy común, debido a que el micoplasma es un tipo de bacteria que no presenta pared celular y que al presentar un tamaño de menos de 1 μm , puede entrar en los linajes celulares. Este tipo de contaminación es difícil de percibir porque no generan cambios en el medio de cultivo y no se pueden ver en el microscopio. Aunque no pueda verse se ha demostrado que afecta en la tasa de replicación celular y alteraciones metabólicas del linaje estudiado, entre otras. Es por ello que es importante constantemente este tipo de ensayos (RAMOS, J. 2020).

5.3. CÉLULAS A549

5.3.1. Tinción de fluorescencia A549 con DAPI

Las células A549 crecieron como lo muestra la Imagen 5, aunque de forma más lenta, también se pudo obtener una cantidad considerable y se hizo una prueba de fluorescencia para detectar si había contaminación en el linaje, y por medio de la coloración con DAPI se pudo determinar que el linaje no tenía contaminación, como lo muestra la imagen 6, la no existencia de contaminación es importante debido a que se garantiza que los resultado de viabilidad celular se deben al efecto del aceite esencial y no se asocia a la contaminación.

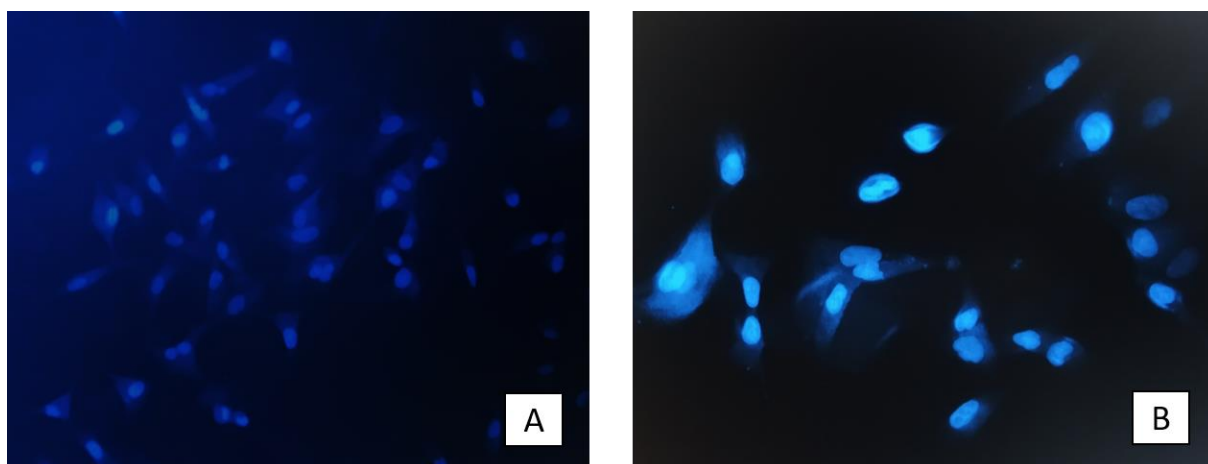
Imagen 5. Microscopia óptica de células A549, 4x (A), 10x (B), 40x (C).



Fuente: Johana Regalado, 2021.

Nota. La imagen muestra las células A549 con microscopia óptica; (A) con aumento 4x y una confluencia mayor del 70% de las células A549; (B) con aumento de 10x; (C) aumento de 40x donde se nota la morfología celular.

Imagen 6. Microscopia de fluorescencia de células A549, 20x (A), 40x (B).



Fuente: Johana Regalado, 2021

Nota. La imagen muestra las células A549 con microscopia de fluorescencia, tinción de fluorescencia usando DAPI, marcando el núcleo celular; (A) con aumento 20x; (B) con aumento de 40x.

5.3.2. Viabilidad celular A549

Primero se determinó que la viabilidad celular (relación entre células vivas y el total de células), fuera mayor a 90% con el azul de tripano, para tener certeza que las células estuvieran creciendo, por lo que se continuó con el ensayo.

El azul de tripano, es un colorante que solo ingresa a las células cuando la membrana no está íntegra o cuando la célula está muerta, por lo que la célula en estas condiciones queda con un tono azul, en cambio las células vivas pueden ser diferenciadas por su tono transparente a la luz del microscopio (RAMOS, J. 2020).

En seguida se hizo pruebas de proliferación celular que permiten determinar la cantidad de células vivas o muertas, esta medición muestra la eficacia de una sustancia tratamiento sobre las células tumorales.

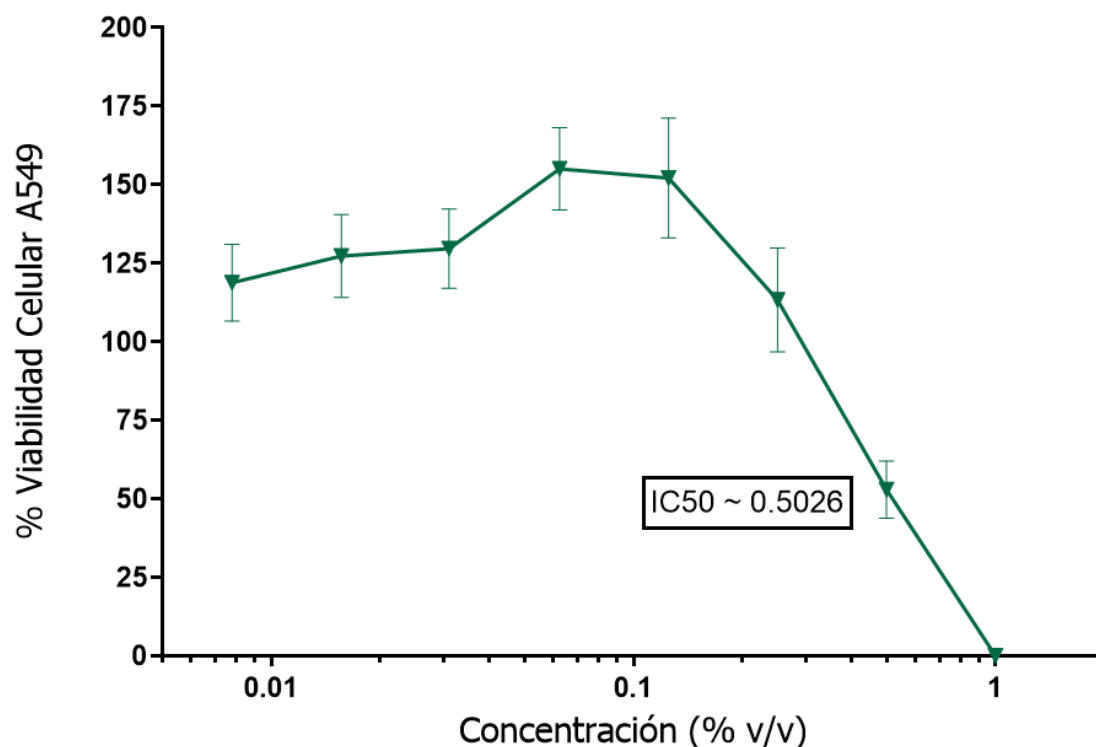
Para poder ver el efecto del aceite esencial de *G. americana* sobre la variación entre células vivas y muertas, se utilizó el ensayo de MTT que permite medir la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas, determinando el efecto citotóxico del aceite esencial de jenipapo.

El MTT es una sal de color amarillo que es soluble en agua y es permeable a las membranas celulares en las células vivas, este compuesto entra a las células y forma cristales de formazan de color púrpura que no son solubles en agua, esto se da porque se une el anillo tetrazolio al MTT por el efecto de enzimas mitocondriales (Ramos, J. 2020).

El formazan puede ser medido por un espectrofotómetro, debido a que la cantidad de células vivas que queda después del tratamiento es proporcional a la absorbancia que se encontró, es por ello que se hizo un ajuste en las medidas que asocia la absorbancia con la viabilidad celular (Ramos, J. 2020).

Como se muestra en la imagen 7, en donde se observa que a medida que la concentración de aceite jenipapo aumenta, la viabilidad celular de las células A549 disminuye, obteniendo que el IC₅₀ es aproximadamente 0.5026 v/v.

Imagen 7. Viabilidad celular A549



Fuente: Johana Regalado, 2021.

Nota. La imagen muestra la viabilidad de las células A549 con la capacidad citotóxica, y donde se determinó el IC50 de 0.5026, que se calculó con regresión no lineal. Las líneas verdes indican la Desviación Patrón de los datos obtenidos, siendo que se hicieron 6 réplicas para cada concentración que se usó; y la concentración v/v proviene de μl de aceite en ml de medio ($\mu\text{l}/\text{ml}$).

A pesar que el MTT es un ensayo sencillo y se obtienen datos de forma rápida y efectiva, no se puede diferenciar células muertas, de células que están en apoptosis, ya que indica solo daños irreversibles, con todo es una técnica bastante útil (LOPEZ, E. 2019).

El IC50 representa la concentración inhibitoria media o la capacidad que el aceite de jenipapo tiene para matar a las células tumorales A549 (FIOCRUZ, 2009). Es por ello que un valor de IC50 menor indica que el compuesto es más activo, con esto se puede decir que el aceite esencial de *G. americana* es altamente concentrado y activo por su IC50 de 0.5026 v/v.

Este resultado producido por la aplicación del aceite esencial en las células tumorales se asocia a los efectos que en general tienen los aceites esenciales, debido a su compleja composición que han demostrado tener efectos antioxidantes, anticancerígenas y antimutagénicos, con efectos tanto como quimiopreventivos como

supresores de cáncer (PAEZ, G. *et. al.* 2019).

En este caso se asocia con el efecto supresor, relacionado con la inducción de las células a la apoptosis que se desencadena por la alteración de diversas vías de señalización, modificaciones del material genético y en la concentración de proteínas intracelulares. Además se ha demostrado que los aceites esenciales generalmente son citotóxicos con células cancerígenas y que conducen al crecimiento de las células sanas (PAEZ, G. *et. al.* 2019).

Como muestra el Anexo 1 los compuestos que se encontraron en mayor proporción en la muestra de aceite esencial utilizada en esta investigación están: hexanol, 2-hexanol, hexanal, hidroxitolueno butilado, y benzoato de hexilo.

El hexano ha mostrado capacidad antiproliferativa de células tumorales, incluyendo las relacionadas al cáncer de pulmón, siendo un compuesto promisorio para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, ya que estudios indican la actividad inhibitoria de este compuesto al glutatión S-transferasas (Federici, L. *et. al.* 2009).

Las glutatión S-transferasas son una superfamilia de isoenzimas que catalizan la reacción de glutatión a sustratos xenobioticos, para la desintoxicación, relacionado con la resistencia a la quimioterapia (Federici, L. *et. al.* 2009). Además ha demostrado tener efectos apoptoticos y citotóxicos en células tumorales, en concentraciones micro y submicromolares (SHA, H. *et. al.* 2018).

El hidroxitolueno butilado es un compuesto conocido por su capacidad antioxidante, el cual dona un radical libre en la oxidación, lo que interrumpe las reacciones de compuestos indeseables (GONÇALVES, R. 2014).

En otros estudios con camundongos tratados con este compuesto se logró observar mayor tiempo de vida, en comparación con el control y reducción en la incidencia de carcinoma, además de inhibir o retardar el crecimiento de tumores, lo que se asocia como anticarcinogenico, en las dosis estudiadas (GONÇALVES, R. 2014).

El benzoato de hexilo es un compuesto que ha demostrado no ser clastogenico, ósea que no causa mutagenesis en el cromosoma, ni se observó potencial genotoxico (APIA, A., *et. al.* 2018).

5.4. CONTAMINACIÓN CELULAR

En medio del desarrollo de la metodología se presentó contaminación celular como se muestra en la imagen 8, aunque la contaminación revelada es por

hongos también se presentó contaminación por bacterias y micoplasma evidenciado en la imagen 4.

La contaminación es recurrente principalmente en los laboratorios, ya sean biológicos o universitarios para uso académico, y las fuentes de contaminación son diversas, entre ellas podemos mencionar; los propios materiales de laboratorio, estufas no regulados; el uso inadecuado de reactivos, así como su almacenamiento y la inexperiencia del manipulador celular (RAMOS, J. 2020).

Es sumamente importante y relevante que los laboratorios busquen utilizar protocolos que sean capaces de detectar estas contaminaciones con carácter de urgencia, ya que esto evitaría y buscaría soluciones para sortear el problema, evitando problemas económicos y futuros con el gasto excesivo de materiales.

Imagen 8. Contaminación por hongo



Fuente: Autor, 2021

Nota. La imagen muestra contaminación por hongo en la jarra de cultivo celular, que por su crecimiento mato todas las células que se estaban cultivando.

6. CONCLUSIONES

Con lo anterior se puede concluir que, aunque hubo linajes células que después de la congelación, no sobrevivieron, otros linajes celulares si funcionaron, con los cuales se pudieron trabajar.

Además que el aceite esencial de *G. americana* presenta características citotóxicas sobre las células A549, y se encontró que el IC50 es 0.5926 v/v, esto debido a la diversidad de compuestos encontrados en la muestra que se utilizó, formada principalmente por hexanol, 2-hexanol, hexanal, hidroxitolueno butilado, y benzoato de hexilo.

Por otra parte se pudo evidenciar la presencia de contaminación por micoplasma, por hongo y por bacterias, que afectaron en el desenvolvimiento de los experimentos, por lo que es importante tener presente los cuidados de manipulación que se debe tener en el trabajo con linajes celulares.

7. REFERENCIAS

- ALVES, J. (2017). Iridoids from leaf extract of *Genipa americana*. Disponible en: <<https://www.scielo.br/j/rbfar/a/Qz5mzvghfJJ93494PTMsfGF/?lang=en>>. Acceso en: 27 mayo. 2021.
- APIA, A., BELSITO D., BOTELHO, D., BRUZE, M., BURTON G. et. al. (2018). RIFM fragrance ingredient safety assessment, hexyl benzoate, CAS Registry Number 6789-88-4.
- ARAUJO, L. et al. (2018). Câncer de pulmão no Brasil. Disponible en: <https://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v44n1/pt_1806-3713-jbpneu-44-01-00055.pdf> Acceso en: 28 abril 2021.
- AZEVEDO, C. ROSA, J. Ministério da Saúde. PLANTAS MEDICINAIS DO JARDIM BOTÂNICO DE PORTO ALEGRE. Puerto Alegre, Brasil. (2018). Pag. 19-28.
- BARBOSA, D. AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE *Genipa americana* L. (RUBIACEAE). Rio de Janeiro, 2008.
- CARVALHO, B. et al. El papel de C-Met y VEGFR2 en la resistencia del glioblastoma a bevacizumab. *Scientific Reports* , v. 11, n. 1, pág. 6067, 16 mar. 2021.
- CORTIÑAS, A. (2005). ACEITE ESSENCIALES-PDF. [sd] Disponible en: <https://www.academia.edu/17182603/ACEITE_ESSENCIALES_PDF>. Acceso en: 27 mayo. 2021.
- DREYER, S. et al. Enfocándose en la respuesta al daño del ADN y el estrés por replicación en el cáncer de páncreas. *Gastroenterología* , v. 160, n. 1, pág. 362-377.e13, 1 ene. 2021.
- ERTHAL, R. et al. Estimativa dos custos da assistência do câncer de pulmão avançado em hospital público de referência, 2017. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Disponible en: <https://www.scielo.br/pdf/rsp/v51/pt_0034-8910-rsp-S1518-87872017051006665.pdf>. Acceso en: 26 de abril. 2021.
- FEDERICI, L., STERZO, C., PEZZOLA, S., DI MATTEO, A., SCALONI, F., FEDERICI, G., CACCURI, A. (2009). Structural Basis for the Binding of the Anticancer Compound 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio)Hexanol to Human Glutathione S-Transferases
- FERREIRA, J. (2014). Estudo Químico e Biológico de *Genipa americana* L. (jenipapo). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Disponible en: <https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/22388/1/EstudoQu%C3%ADmicoBiolo%C3%B3gico_Alves_2014.pdf>. Acceso en: 27 maio. 2021.
- FIOCRUZ. (2009). Estudo in vitro revela composto com alta atividade e seletividade contra o *T. cruzi*.
- GONÇALVES, R. (2014). Actividade antioxidante e extratos vegetais: estudo das

condições de extração e aplicação em sistemas lipídicos.

GOMES, S. NOGUEIRA, P. MORALES, V. (2011). Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. Disponible en: <<https://www.scielo.br/pdf/eq/v36n1/a05v36n1.pdf>>. Acceso en: 27 mayo. 2021.

INCA (Instituto Nacional del Cancer). ABC DO CANCER. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Serviço de Edição e Informação Técnico-Científica/CEDC, 2011. Disponible en: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf>. Acceso en: 26 de abril. 2021, pág. 17-24.

INCA (Instituto Nacional del Cancer). Cancer no Brasil, 2010. Disponible en: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//registro_de_base_populacional_completo.pdf>. Acceso en: 05 de octubre 2021, pág. 23.

INCA (Instituto Nacional del Cancer). Câncer de pâncreas, 2021. Disponible en: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pancreas>>. Acceso en: 05 de octubre 2021, pág. 23.

INCA (Instituto Nacional del Cancer). Câncer do sistema nervoso central, 2020. Disponible en: < <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-sistema-nervoso-central> >. Acceso en: 05 de octubre 2021, pág. 23.

Jenipapo (*Genipa americana* L.) . , [Dakota del Sur]. Disponible en: <<https://www.aplantadavez.com.br/2015/10/jenipapo-genipa-americana-l.html>>. Acceso en: 27 mayo. 2021.

KEITH, R. (Marzo, 2018). Carcinoma pulmonar - Distúrbios pulmonares. Disponible en: <<https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/dist%C3%BArbios-pulmonares/tumores-dos-pulm%C3%B5es/carcinoma-pulmonar>>. Acceso en: 27 mayo. 2021.

KOKKINOS, J. et al. Enfocándonos en las personas no farmacológicas en el cáncer de pâncreas mediante el uso de fármacos silenciadores de genes basados en nano. *Biomateriales*, v. 240, pág. 119742, 1 de mayo de 2020.

LEVY, M. et. al. (2017). La maquinaria de la autofagia controla la muerte celular al cambiar entre apoptosis y necroptosis. *Célula de desarrollo* , v. 37, n. 4, pág. 337–349, 23 de mayo de 2016.

LOPEZ, E. (2019). MÉTODOS PARA DETERMINAR LA VIABILIDAD CELULAR CON APLICACIÓN EN ODONTOLOGÍA. Pág. 14.

PAEZ, G. et. al. (2019). Uso de aceites esenciales como agentes quimiopreventivos contra el cáncer colorrectal. *Revista Médico-Científica de la Secretaría de Salud Jalisco*. Disponible en: < <https://www.medigraphic.com/pdfs/saljalisco/sj-2019/sj193h.pdf> >. Acceso en: 27 mayo. 2021.

POLÍTICAS PÚBLICAS DE SAÚDE. Fisiopatologia do câncer. [s. d.]. Disponible en: <[https://www.saudedireta.com.br/docsupload/1340285423cap2%20\(1\).pdf](https://www.saudedireta.com.br/docsupload/1340285423cap2%20(1).pdf)>. Acceso en: 26 de abril. 2021.

RAMALHO, P. Jenipapeiro. Circular técnica. Embrapa Florestas. (Diciembre de 2003). ISSN 1517-5278.

RAMOS, J. (2020). Cultivo de células da teoria à bancada. Editora UFPB Pag. 99-100

SHA, H., WANG, Z., DONG, S. (2018). 6- (7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-iltio) hexanol: un nuevo compuesto contra el cáncer prometedor.

YEINI, E. et al. El eje de la P-selectina juega un papel clave en el inmunofenotipo de microglia y la progresión del glioblastoma. Nature Communications , v. 12, n. 1, pág. 1912, 26 de marzo. 2021.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO 1. Muestra aceite esencial de *G.americana*

Table X: Relative composition (%) of the identified components in the analyses of the essential oils from ***Genipa americana***

Components	RI ^a	RI ^b	<i>Genipa americana</i>
Hexenal	844	855	8,35
Hexenol <2E>	858	862	6,38
n-hexenol	860	870	9,82
Hexadienal <(2E,4E)>	909	909	0,5
α -Pinene	931	939	0,41
1-Octen-3-ol	977	979	0,9
2-Pentyl Furan	992	988	0,62
Benzyl alcohol	1034	1031	0,73
Benzene acetaldeyde	1043	1042	0,58
Hexenal <(2E)>, diethyl acetal methyl salicylate	1100	1098	0,15
	1193	1191	0,4
β -Damascenone <(E)>	1384	1384	0,45
β -Caryophyllene	1418	1419	0,38
Prenyl benzoate	1478	1486	0,4
β -Ionone <(E)>	1486	1488	0,51
Butylated hydroxytoluene	1513	1515	4,09
Hexenyl benzoate <(3Z)>	1570	1566	1,92
Hexyl benzoate <(n)>	1577	1580	1,01
Hexenyl benzoate <(2E)>	1585	1587	0,9
Isobornyl isobutanoate <5-oxy->	1596	1603	0,56
epi- α -Bisabolol	1684	1684	0,37
Benzyl benzoate	1766	1760	0,55
Total identified (%)			39,98

RI^a: values of calculated relative retention indices using the column RTX-5(GCMS) and the n-alkanes series C8–C19. RI^b: published relative retention indices for the apolar column DB-51; *: means of calculated relative compositions using the column OV-5 (GC-FID) and the n-alkanes series C8–C19.

Reference: Adams, R. P., 2009. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, 4th. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.