

Evaluación de la toxicidad aguda oral y de la actividad antimicrobiana de una mezcla de aceite de hígado de tiburones de Cuba

Assessment of the oral acute toxicity and the antimicrobial activity of an oily mixture from shark's liver of Cuba

Caridad Margarita García Peña^I; Addis Bellma Menéndez^{II}; Gerardo Baró Román^{III}; Mirna Fernández Cervera^{IV}; Mirta Castiñeira Díaz^{IV}; Lyi Wong Trujillo^V; Isbel Guerra Sardiñas^{VI}; Micaela Couret Trápaga^{VI}

^IMáster en Tecnología y Control de Medicamentos. Investigadora Agregada. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana, Cuba.

^{II}Máster en Fisiología Animal. Investigadora Agregada. CIDEM. La Habana, Cuba.

^{III}Licenciado en Microbiología. Centro de Inmunoensayo. La Habana, Cuba.

^{IV}Doctora en Ciencias. Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). La Habana, Cuba.

^VLicenciada en Ciencias Farmacéuticas. IFAL. La Habana, Cuba.

^{VI}Técnico Medio en Procesos Biológicos. CIDEM. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Se evaluó la toxicidad aguda oral y la actividad antimicrobiana de una mezcla de aceites de hígado de tiburón, de las especies *Rhincodon typu* (tiburón ballena) y *Galeocerdo cuvier* (tiburón tigre), que habitan en zonas aledañas a las costas del litoral norte occidental de Cuba, para su posterior uso farmacéutico, debido a que presenta un alto contenido de vitaminas y de ácidos grasos, que le confieren actividad antioxidante y antiinflamatoria. El estudio de la toxicidad aguda oral demostró que la mezcla de aceites de hígado de tiburones, no provocó alteraciones macroscópicas en los órganos extraídos, ni síntomas tóxicos severos, ni mortalidad de ninguno de los animales empleados en el estudio a la dosis de 20 mL/kg. Los resultados del estudio de la actividad antimicrobiana demostraron una ligera actividad bacteriostática frente a *K. pneumoniae*; además una actividad antifúngica frente a *Microsporium canis*; y resistencia frente a *C. albicans* y *T. mentagrophytes* a las concentraciones evaluadas.

Palabras clave: Toxicidad aguda oral, aceite de hígado de tiburones, *Rhincodon typu*, *Galeocerdo cuvier*.

ABSTRACT

The total acute toxicity and the antimicrobial activity of an oil mixtures from shark liver of *Rhincodon typu* (whale-shark) and *Galeocerdo cuvier* (tiger-shark) was assessed in species leaving in the adjacent costs of Cuban northern coastal for its subsequent pharmaceutical use due to its high content of vitamins and fatty acids and its antioxidant and anti-inflammatory activity. Study of oral acute toxicity

demonstrated that oil mixture of shark liver hasn't macroscopic alterations in removed organs, severe toxic symptoms and on mortality of any animals used in study at 20 mL/kg dose. Study results of antimicrobial activity showed a slight bacteriostatic activity against *K. pneumoniae* and an antifungal activity against *Microsporium canis*, and a resistance against *C. albicans* and *T. mentagrophytes* at assessed concentrations.

Key words: Oral acute toxicity, shark liver oil, *Rhincodon typu*, *Galeocerdo cuvie*.

INTRODUCCIÓN

Los escualos (tiburones) son de gran importancia para la alimentación, la artesanía, la preparación de piensos, como fertilizante y también en la industria médico-farmacéutica, se encuentran dispersos por los mares del mundo y adyacentes a las aguas de Cuba se localizan diversas especies. El hígado de los tiburones contiene sustancias biológicas activas como las vitaminas, los ácidos grasos poliinsaturados, lípidos, éteres de glicerilo y el escualeno.¹

Estudios realizados en Suecia, confirman que el componente principal del aceite de hígado, los alquilgliceroles, ayudan en la protección contra 3 tipos de agresores comunes: infecciones virales, bacterianas y fúngicas. Brindan beneficios que se insertan en la estimulación del sistema inmunológico, incremento de anticuerpos, trombocitos y leucocitos. En particular se ha encontrado que estos disminuyen la mortalidad por cáncer de mama y detiene la progresión de enfermedades degenerativas. En estudios preclínicos que utilizaron escualamina se demostró su capacidad como un nuevo tipo de inhibidor de la angiogénesis.

El aceite de hígado de tiburón se emplea en la producción de suplementos alimenticios. Se utiliza en la industria cosmética pues muestra propiedades emolientes que suavizan la piel por la presencia de escualeno en su composición. Al contener grandes cantidades de vitamina A, tiene efectos sobre el envejecimiento, puesto que esta vitamina actúa como antioxidante y disminuye el daño de la peroxidación lipídica (POL) sobre las células del organismo.²

En el presente trabajo se empleó la mezcla de aceite de hígados de tiburones de las especies *Rhincodon typu* (tiburón ballena) y *Galeocerdo cuvier* (tiburón tigre), se tomó 2 ejemplares de cada especie, de animales cuyo habitat era aledaño a las costas cubanas, específicamente del litoral norte occidental.

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la toxicidad aguda oral y la actividad antimicrobiana de la mezcla de aceite de hígado de tiburones de Cuba, porque no existían evidencias de su toxicidad y su actividad antimicrobiana para su posterior empleo en diferentes formas farmacéuticas.

MÉTODOS

En el presente trabajo se empleó una muestra de una mezcla de aceites de hígado de tiburón, obtenida a escala de banco en el Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP, Cuba).

La extracción del aceite se realizó por calor, método más utilizado porque se favorece la liberación del aceite de las células hepáticas e inactiva las enzimas lipolíticas que causan la hidrólisis de los lípidos. Durante el calentamiento pueden tener lugar procesos oxidativos de los lípidos debido al efecto de la temperatura, el tiempo de calentamiento y el grado de instauración del aceite.³

El aceite empleado en el presente estudio fue analizado desde el punto de vista físico, químico y microbiológico y comparado con aceites de tiburones capturados en las costas centrales y occidentales los cuales no difieren ($p > 0,05$) en cuanto a su composición físico-química. En el estudio de físico-químico realizado se constató que era un líquido traslúcido de color amarillo, con olor característico a marisco; presentaba 245,58 μg de vitamina A/g de aceite, 180,47 μg de vitamina D/g de aceite; 22,46 vitamina E/g de aceite y 31,72 % de ácido palmítico.

Evaluación de la toxicidad aguda oral

El presente estudio se realizó siguiendo las pautas del Consejo Canadiense para el cuidado animal,⁴ el mismo fue aprobado en el Comité Ético del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM).

En el estudio de la determinación de la toxicidad aguda oral del aceite de hígado de tiburón se emplearon 12 ratas Wistar hembras de peso corporal entre 150 y 200 g procedentes de la colonia de la UCTB Control Biológico, las cuales fueron mantenidas en un cuarto a temperatura controlada de 20 ± 2 °C y ciclo de luz/oscuridad de 12-12 h. La alimentación consistió en dieta estándar para ratas y ratones proveniente del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) y agua acidulada con el fin de neutralizar la carga microbiana de esta administrada a voluntad.

Los animales fueron distribuidos al azar en 2 grupos experimentales: tratados con la mezcla de aceite de hígado de tiburón (6 animales) y un segundo grupo control negativo tratados con solución salina al 0,9 % (6 animales). Fueron identificados individualmente para la dosificación exacta de acuerdo con su peso corporal mediante un sistema de marcaje con ácido pícrico.

La sustancia de prueba se administró vía oral mediante cánula intragástrica, para lo cual se retiró la comida a los animales 16 h antes de la administración. La dosis administrada de la sustancia de ensayo fue de 20 mL/kg de peso corporal correspondiente al volumen máximo de administración. El peso corporal se registró al inicio, a los 7 días y al final del experimento, observando el comportamiento del mismo durante el estudio.

Todos los animales fueron observados cada 1 h durante las primeras 8 h, continuando la observación diariamente durante un período de catorce días, se registró cualquier síntoma tóxico así como sus manifestaciones clínicas. Al finalizar este período se procedió al sacrificio por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a dosis de 80 mg/kg, posteriormente se procedió a la autopsia, efectuándose un examen macroscópico minucioso de órganos y tejidos, con el objetivo de determinar si existían alteraciones macroscópicas en todos los órganos del animal, así como síntomas tóxicos severos a la dosis de administración evaluada, para su posterior clasificación según el Sistema Armonizado de la OECD (Guideline For Testing of Chemical «Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method».⁵

Evaluación de la actividad antimicrobiana

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó en 3 pasos: tamizaje general, determinación de la concentración mínima inhibitoria, determinación de la concentración mínima bactericida. El medio de cultivo para los hongos fue subouraud dextrosa agar (oxid, Inglaterra) y para las bacterias de triptona soya agar (oxid, Inglaterra). Se empleó el método de las diluciones seriadas en medio líquido y una batería integrada por 4 microorganismos controles: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10033, *Candida albicans* ATCC 10231, *Trichophyton mentagropytes* y *Microsporium canis*. Para determinar la concentración mínima inhibitoria (MCI) se utilizó el mismo método anterior frente a aquellas cepas que fueron sensibles durante el tamizaje. Se trabajó en un intervalo de concentración entre 0,09-100 mg/mL y se incubaron a 28 y 37 °C; se analizaron a las 24 h, 48 h y 15 días.

Para la determinación de la concentración mínima bactericida, el inóculo empleado fue de 10^5 para las bacterias y la levadura, y 10^4 UFC/mL para los dermatofitos; para ello se empleó el contador de colonias Gallenkamp (Inglaterra).⁶

Procesamiento estadístico

En el procesamiento estadístico en la evaluación toxicológica fue utilizado un análisis de varianza (ANOVA) cuyas medias fueron comparadas según la prueba de rangos múltiples de Duncan.⁷ Mientras que el procesamiento estadístico en la evaluación de la actividad antimicrobiana realizó primeramente un análisis descriptivo en el cual se calcularon la media y la desviación estándar para cada concentración de aceite empleada en el estudio. Se aplicó además el ensayo de normalidad por Anderson-Darling y el ensayo de homogeneidad de varianza de Levene. Ensayo de comparación múltiple de medias de Student-Newman-Keuls, para determinar diferencias entre grupos. El nivel de significación estadística, empleado en todos los casos, fue como mínimo de $p < 0,05$. Los datos fueron procesados utilizando el paquete estadístico MINITAB, versión 14.0.

RESULTADOS

Evaluación de la toxicidad aguda oral

No se observó muerte de ningún animal, en cambio sí síntomas clínicos a los 5 min de la administración de la sustancia de prueba, estos fueron sedación y piloerección donde el aceite se transpiraba a través de la piel. Cabe destacar con respecto a la ligera sedación observada en los animales, que este síntoma desapareció entre las 3 o 4 h después de la administración, sin embargo, se mantuvo la piloerección durante la primera semana posterior a la administración.

A su vez, el peso corporal se incrementó de forma significativa ($p < 0,01$) durante el estudio y su comportamiento fue similar para los 2 grupos experimentales, como se observa en la [figura](#).

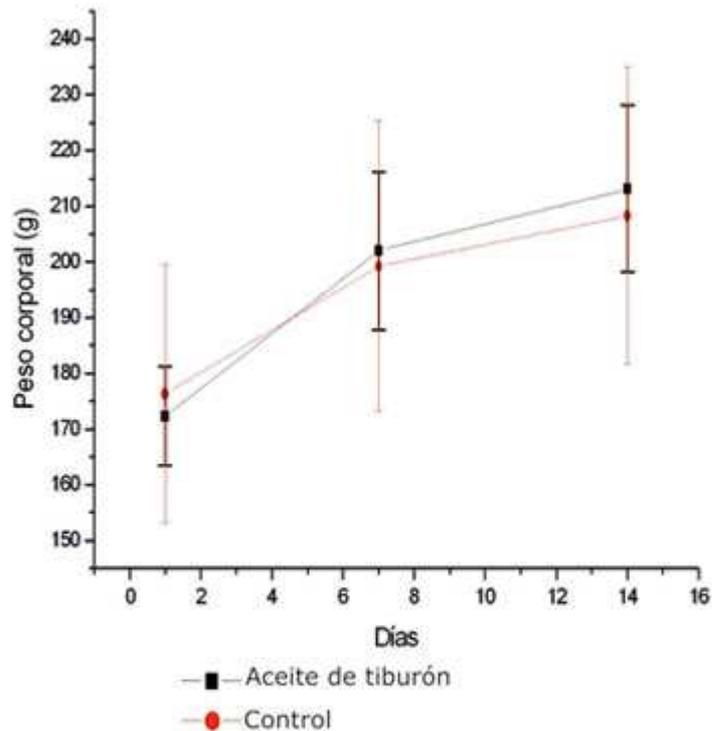


Fig. Comportamiento del peso corporal durante el estudio de toxicidad aguda oral del pool de aceite de hígado de tiburón.

La ganancia de peso corporal durante el estudio fue estadísticamente similar para todos los grupos experimentales; no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos.

En la autopsia realizada no se encontraron alteraciones macroscópicas en ninguno de los órganos extraídos.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Solo se encontró una ligera actividad bacteriostática frente a *K. pneumoniae* (CMI= 100 mg/mL); *C. albicans* y *T. mentagrophytes* resultaron igualmente resistentes a las concentraciones de la mezcla de aceite de hígado de tiburón evaluadas. Por el contrario, la mezcla de aceites mostró actividad antifúngica frente a *Microsporium canis*, con valores de CMI= CMF= 13,8 mg/mL

DISCUSIÓN

Evaluación de la toxicidad aguda oral

No existen reportes en la literatura de estudios similares en aceites de hígados de tiburones de otros lugares, ni en aceites de pescados, de ahí la importancia de este estudio.

La administración de la mezcla de aceite de hígado de tiburón no provocó la muerte ni síntomas tóxicos severos a la dosis de 20 mL/kg. A pesar de observarse en el estudio síntomas tóxicos ligeros como fueron la piloerección y la sedación que desaparecieron en el tiempo de estudio, a la observación macroscópica de los orgánicos no se observaron alteraciones en ninguno de los órganos extraídos. De

acuerdo con estos resultados y tomando en consideración los criterios para la clasificación de una sustancia de ensayo según sistema de clasificación de GHS, la mezcla de aceite de hígado de tiburón se corresponde con la categoría 5 (no clasifica como tóxico).

Evaluación de la actividad antimicrobiana

La ausencia de estudios científicos anteriores sobre la actividad antimicrobiana del aceite de hígado de tiburón justifica la investigación realizada. Los resultados de la actividad antimicrobiana del aceite va a depender de las características específicas de los principios activos presentes en él y de su solubilidad en los solventes empleados para la extracción.

La actividad del aceite frente a algunas cepas fue bacteriostática y antifúngica. No se pueden comparar los valores de concentración mínima bactericida con los valores de concentración mínima inhibitoria para cada cepa, por haber utilizado métodos diferentes para ambas determinaciones.

No existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las medias obtenidas en el tiempo inicial y el tiempo final de estudio.

La mezcla de aceites de hígado de tiburones costeros de Cuba, presenta vitaminas A, D y E; la A y la D son las de mayor proporción;^{8,9} estos resultados se encuentran en correspondencia con los obtenidos por Adeniyi y otros en el 2006¹⁰ al evaluar la presencia de estas vitaminas en aceites de otras especies de tiburones, además de encontrarse un alto contenido de ácidos grasos,¹¹ escualeno, los que le confieren propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. Estos compuestos identificados y cuantificados en la mezcla de aceite no ofrecen toxicidad alguna para su empleo como materia prima natural en el desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas, y posibilitan que el aceite presente actividad antimicrobiana frente a los diferentes microorganismos evaluados. Resultando la mezcla de aceite de tiburones costeros de Cuba un principio activo ideal para el desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas de origen natural.

En conclusión, la mezcla de aceite de hígado de tiburones evaluadas, no provocó la muerte, ni síntomas de toxicidad retardada severos tras la administración oral de 20 mL/kg en ratas, correspondiéndose con la categoría 5 (no clasifica como tóxico).

La mezcla de aceites mostró actividad antifúngica frente a *Microsporum canis*; se encontró una ligera actividad bacteriostática frente a *K. pneumoniae* y resistente a las concentraciones de la mezcla evaluada frente a *C. albicans* y *T. mentagrophytes*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Espinosa LI. Aspectos biológicos pesqueros de los tiburones en las aguas cubanas. Memorias. La Habana: Mar; 2006. p. 1-21.
2. Guitar D. Los tiburones. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1997. p. 20-24.
3. García Espinosa, E. Caracterización de lípidos en aceite de hígados de tiburones costeros de Cuba. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. 6 (8): 697 _ 701. 2005 Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080505.html>

4. Olfert ED, BM Cross & AA. McWilliam. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. Consejo canadiense de protección de los animales. 1998. Disponible en: <http://www.fcv.unl.edu.ar/comite/ManualesobreelcuidadoyusodeanimalesdeexperimentacionConsejoCanadiense>
5. OECD Guideline for testing of chemical. Acute oral toxicity-acute toxic class method. No. 423 Adopted 20 December. 2001.
6. Kumar S. Antibacterial activity observed in the seeds of some coprophilous plants. J. Pharmaceutical Sci. 1997;35(3):179-84.
7. Sigarroa, A. Biometría y diseño experimental. La Habana: Ed. Pueblo y Educación; 1985. p. 787.
8. García Peña CM, M. Castiñeira Díaz, M. Fernández Cervera, J.A. Romero Díaz, SM. Collazo Quintana, Mancebo Dorvigny B, et al. Determinación por CLAR, de las vitaminas A y D en el pool de aceite de hígado de tiburón. Lat Am J Pharm. 2008;2(3):419-24.
9. García Peña CM, Castiñeira Díaz M, Fernández Cervera M, Romero Díaz JA, Collazo Quintana SM, Arcia Terencio A. Determinación por CLAR, de la vitamina E en el pool de aceite de hígado de tiburón. Lat Am Pharm. 2008;27(4):771-5.
10. Adeniyi OD, Bawa AA. Mackerel (Scomber Scrombrus) oil extraction and evaluation as raw materials for industrial utilization. Leonardo J Sci. 2006;8:33-42.
11. Cruz Nuñez G, Palmadóttir H, Jónsdóttir R, García Rodríguez E. Quality of cuban shark liver oil. Comparison with icelandic cod liver oil. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. 10 (2). 2009. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020209.html>

Recibido: 8 de abril de 2010.

Aprobado: 17 de mayo de 2010.

M. C. *Caridad Margarita García Peña*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave. 26 No. 1 605 entre Boyeros y Puentes Grandes. CP 10 600. Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba. Correo electrónico: caridadgp@infomed.sld.cu