

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
INSTITUTO DE FARMACIA Y ALIMENTOS

Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L.

Aymé Fernández-Calienes Valdés,¹ Judith Mendiola Martínez,² Lianet Monzote Fidalgo,³ Marley García Parra,⁴ Idalia Sariago Ramos,⁵ Deyanira Acuña Rodríguez,⁶ Ramón Scull Lizama⁷ y Yamilet Gutiérrez Gaitén⁸

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: el ensayo de letalidad de *Artemia salina* es considerado una herramienta útil para la determinación preliminar de toxicidad de extractos de plantas. En nuestros laboratorios se estudian las potencialidades antiparasitarias de varias especies de plantas. **OBJETIVO:** evaluar la mortalidad causada por extractos etanólicos de plantas medicinales cubanas sobre larvas de *A. salina*. **MÉTODOS:** las larvas de *A. salina* se expusieron durante 24 h a 4 concentraciones de los 35 extractos etanólicos, pertenecientes a 34 especies de plantas. Se determinó la concentración letal media (CL₅₀), lo cual permitió asignar cada extracto a las categorías de extremadamente tóxico, muy tóxico, moderadamente tóxico y no tóxico. **RESULTADOS:** del total de extractos evaluados solo 5 (*Artemisia absinthium*, *Luffa cylindrica*, *Melia azedarach*, *Melaleuca leucadendron* y *Simarouba glauca*) resultaron extremadamente tóxicos o muy tóxicos, 13 moderadamente tóxicos, mientras que 17 extractos (48,5 %) se clasificaron como no tóxicos al exhibir valores de CL₅₀ superiores a 1 000 µg/mL. **CONCLUSIONES:** la mayoría de los extractos evaluados mostraron baja toxicidad en este modelo, lo cual resulta favorable. Los 5 extractos de mayor toxicidad no serán incluidos en estudios posteriores.

Palabras clave: toxicidad, extractos de plantas, *Artemia salina*.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos muy antiguos las plantas han sido utilizadas como medicinas. Varias especies de plantas han demostrado su potencial para proveer drogas efectivas contra enfermedades parasitarias, por lo que, muchos grupos de investigación se dedican a evaluar extractos vegetales como estrategia para hallar nuevas alternativas terapéuticas frente a estas afecciones.

Sin embargo, es bien conocido que muchas plantas pueden ocasionar reacciones tóxicas a quienes las utilizan.¹ Por esta razón, se llevan a cabo investigaciones con el propósito de determinar, además de la acción farmacológica, la toxicidad de las plantas medicinales.

La evaluación toxicológica preclínica se realiza rutinariamente en ratones. El elevado costo de estas pruebas así como el sufrimiento causado a los animales ha motivado el reemplazo de experimentos

¹ Máster en Bioquímica. Investigadora Auxiliar. Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). Ciudad de La Habana, Cuba.

² Máster en Bioquímica. Investigadora Auxiliar. Instructora. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

³ Máster en Farmacia. Investigadora Agregada. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

⁴ Máster en Parasitología. Aspirante a Investigador. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

⁵ Máster en Parasitología. Investigadora Auxiliar. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

⁶ Técnica. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

⁷ Máster en Farmacia. Departamento de Farmacia, Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). Ciudad de La Habana, Cuba.

⁸ Máster en Farmacia. IFAL. Ciudad de La Habana, Cuba.

que utilicen animales de laboratorio, la reducción del número de animales usados en cada prueba o el perfeccionamiento de las metodologías existentes con el propósito de reducir el dolor y el estrés a los animales.²

El ensayo de letalidad de *Artemia salina* se basa en la posibilidad de causar la muerte de larvas de este crustáceo cultivadas en el laboratorio. Este método fue propuesto por Michael y otros,³ y posteriormente desarrollado por Vanhaecke y otros,⁴ así como Sleet y Brendel,⁵ con el propósito de contar con una herramienta útil y sencilla para la determinación de toxicidad. Este método, en el cual se determina el valor de la concentración letal media (CL₅₀) de compuestos y extractos en medio salino, ha sido utilizado para la detección de toxinas de hongos⁶ y cianobacterias,⁷ toxicidad de extractos de plantas,^{8,9} metales pesados¹⁰ y para predecir citotoxicidad de compuestos puros.¹¹

El presente estudio tuvo el propósito de realizar un primer tamizaje de la toxicidad mostrada por extractos de especies de plantas cubanas de interés medicinal, para valorar su inclusión en la evaluación posterior de la actividad antiparasitaria.

MÉTODOS

COLECTA DE LAS PLANTAS Y PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se colectaron partes de 34 especies de plantas, seleccionadas por su utilización como antiparasitarias después de la revisión de literatura etnobotánica. La colecta e identificación de las especies se realizó en el Jardín Botánico Nacional (JBN) por un especialista, en agosto de 2006. El código de entrada al jardín (numeración hecha por los especialistas del JBN) de los especímenes utilizados en el estudio fue registrado como referencia para colectas posteriores. La parte de la planta a evaluar se seleccionó de la información encontrada en la literatura respecto a la forma de utilización de la especie por la población. Cada órgano de la planta se colectó con cuidado para evitar la contaminación con otras partes o con materiales extraños. El material vegetal se secó en una incubadora con ventilación a 30 °C y después se pulverizó en partículas de aproximadamente 5 mm.

Se prepararon 35 extractos etanólicos. La extracción líquida del material seco procesado se realizó mediante la maceración durante 7 d en etanol 80 %. El solvente se eliminó por evaporación a presión reducida por 24 h y el residuo se mantuvo en congelación a - 70 °C al menos 48 h antes de su liofilización.

De cada muestra liofilizada se prepararon soluciones concentradas de 50 mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO) 100 %. Estas soluciones se conservaron a 4 °C hasta su utilización.

OBTENCIÓN DE LAS LARVAS

Quistes de *A. salina*, donados gentilmente por especialistas del Centro de Investigaciones Pesqueras de Cuba, fueron puestos a eclosionar en un recipiente con agua de mar esterilizada, a temperatura ambiente durante 48 h bajo régimen continuo de luz. Después de la incubación, se colocó una fuente de luz a un lado del recipiente para atraer a las larvas y separarlas de los huevos aún sin eclosionar. Los crustáceos se colectaron y trasladaron a los pozos de la placa de ensayo utilizando una pipeta Pasteur. El número de larvas colectadas y añadidas a la placa se determinó utilizando un microscopio estereoscópico.

ENSAYO DE LETALIDAD

El ensayo consistió en exponer grupos de larvas a 4 concentraciones de extracto (1 000, 100, 10 y 1 µg/mL) durante 24 h a temperatura ambiente y bajo régimen continuo de luz. Primero, se prepararon placas de 24 pozos, se añadió a cada uno 1,5 mL de agua de mar suplementada con extracto de levadura (6 mg/mL) y con diluciones del extracto correspondiente. Seguidamente, se transfirieron entre 10 y 15 larvas a cada pozo.

Al finalizar las 24 h de exposición, se contó el número de organismos muertos y se calculó el porcentaje de mortalidad. Las larvas se consideraron muertas si no exhibían movimiento durante varios segundos de observación al microscopio estereoscópico. El experimento se consideró válido si el porcentaje de mortalidad en los controles (po-

zos preparados e incubados en las mismas condiciones pero en ausencia de extracto) no excedió de 10 %.

Cada concentración se evaluó por triplicado y cada extracto se ensayó 2 veces. La concentración letal media (CL_{50}) se calculó mediante interpolación lineal de los valores del porcentaje de mortalidad, para cada concentración, en cada experimento.

El grado de toxicidad del extracto se definió en función del rango en que se encontraron los valores de CL_{50} de acuerdo con las categorías siguientes: extremadamente tóxico ($CL_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$), muy tóxico ($10 < CL_{50} < 100$), moderadamente tóxico ($100 < CL_{50} < 1\ 000$) y no tóxico ($CL_{50} > 1\ 000 \mu\text{g/mL}$).¹²

RESULTADOS

En la tabla se muestran los valores de CL_{50} para los 35 extractos evaluados. Los extractos más letales fueron los de *A. absinthium*, *M. leucadendron*, *M. azedarach*, *S. glauca* y *L. cilindrica*, que exhibiendo valores menores que $100 \mu\text{g/mL}$. De los 30 extractos restantes, cuyos valores de CL_{50} fueron mayores de $100 \mu\text{g/mL}$, 17 (48,5 %) mostraron valores de CL_{50} superiores a $1\ 000 \mu\text{g/mL}$.

La clasificación de los extractos según su grado de toxicidad (tabla) evidencia que 85,7 % de los extractos evaluados se ubican en las categorías de menor toxicidad (moderadamente tóxico y no tóxico).

TABLA. Especies de plantas medicinales cubanas incluidas en el estudio. Valores de concentración letal media (CL_{50}) y clasificación según la toxicidad mostrada frente a larvas de *A. salina*, de extractos etanólicos de estas especies

Especie	Nombre común	Código	Parte colectada	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Categoría de toxicidad
<i>Artemisia absinthium</i> L.	Incienso	9700183	follaje	5,17	Extremadamente tóxico
<i>Annona glabra</i> L.	Bagá	8300098	follaje	> 1000	No tóxico
<i>Allium sativum</i> L.	Ajo	sr	bulbo	> 1000	No tóxico
<i>Bambusa vulgaris</i> Schrad.	Caña brava	9500087	follaje	> 1000	No tóxico
<i>Bidens pilosa</i> L.	Romerillo	9700169	follaje	296,48	Moderadamente tóxico
<i>Bixa orellana</i> L.	Bija	9600288	semilla	213,84	Moderadamente tóxico
<i>Bursera simaruba</i> Sarg.	Almácigo	8603305	follaje	163,56	Moderadamente Tóxico
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.	Caña santa	8700008	follaje	> 1000	No tóxico
<i>Cassia grandis</i> L.	Cañandong	8300069	follaje	> 1000	No tóxico
<i>Curcuma longa</i> L.	Yuquilla	9700178	rizomas	> 1000	No tóxico
<i>Cucurbita maxima</i> L.	Calabaza	sr	semilla	> 1000	No tóxico
<i>Cecropia peltata</i> L.	Yagruma	8603239	follaje	794,3	Moderadamente tóxico
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	Ciprés	8603788	follaje	394,2	Moderadamente tóxico
<i>Hura crepitans</i> L.	Salvadera	8600198	follaje	110,76	Moderadamente tóxico
<i>Indigofera suffruticosa</i> Mill.	Añil cimarrón	0100079	follaje	511,2	Moderadamente tóxico
<i>Lepidium virginicum</i> L.	Mastuerzo	8700259	follaje	928,9	Moderadamente tóxico
<i>Luffa cylindrica</i> (L.) Roem.	Estropajo	8600366	follaje	48,4	Muy tóxico
<i>Melia azedarach</i> L.	Paraíso	8402273	corteza de la raíz	59,8	Muy tóxico
<i>Momordica charantia</i> L.	Cundeamor	9700180	follaje	> 1000	No tóxico
<i>Mangifera indica</i> L.	Mango	9700183	follaje	> 1000	No tóxico
<i>Melaleuca leucadendron</i> L.	Cayeput	8501918	follaje	7,4	Extremadamente tóxico
<i>Ocimum sanctum</i> L.	Albahaca morada	9200485	follaje	> 1000	No tóxico
<i>Petiveria alliacea</i> L.	Anamú	0000244	follaje	> 1000	No tóxico
<i>Parthenium hysterophorus</i> L.	Escoba amarga	9700175	follaje	309,67	Moderadamente tóxico
			raíz	> 1000	No tóxico
<i>Punica granatum</i> L.	Granado	8300050	corteza del fruto	418,5	Moderadamente tóxico
<i>Picramnia pentandra</i> Sw.	Aguedita	8303268	follaje	> 1000	No tóxico
<i>Pluchea odorata</i> Cass. & aut.	Salvia	9700158	follaje	123,3	Moderadamente tóxico
<i>Portulaca oleracea</i> L.	Verdolaga	sr	semilla	> 1000	No tóxico
<i>Simarouba glauca</i> DC.	Gavilán	8300710	follaje	16,32	Muy tóxico
<i>Stachytarpheta jamaicensis</i> (L.) Vahl	Verbena cimarrona	9200475	follaje	273,13	Moderadamente tóxico
<i>Tabernaemontana citrifolia</i> L.	Huevo de gallo	8500720	follaje	> 1000	No tóxico
<i>Tradescantia discolor</i> L'Her.	Cordobán	9200504	follaje	> 1000	No tóxico
<i>Tamarindus indica</i> L.	Tamarindo	8300068	corteza del tallo	> 1000	No tóxico
<i>Turnera ulmifolia</i> L.	Marilope	8602024	follaje	261,03	Moderadamente tóxico

sr: sin número de registro en el Jardín Botánico.

DISCUSIÓN

La detección de extractos de plantas medicinales cubanas con acción antiparasitaria específica es el propósito final de las investigaciones. La fuerte acción citotóxica de un extracto vegetal o la demostración de toxicidad *in vivo* constituyen limitaciones relevantes para la búsqueda.

El ensayo de letalidad de larvas de *A. salina* ha sido utilizado con eficiencia para detectar componentes con acción citotóxica¹¹⁻¹⁴ y ha demostrado buena correlación al evaluar extractos de plantas con la toxicidad aguda oral en ratones.⁹ Estos hallazgos refuerzan la importancia de la utilización de este ensayo como prueba alternativa de toxicidad.

Con vistas a correlacionar la acción tóxica mostrada por extractos de plantas con otras actividades biológicas o con la presencia de determinados componentes químicos, varios autores reportan una clasificación de la toxicidad según el valor de la CL₅₀ del extracto. Aunque estas clasificaciones poseen variaciones entre sí, todas coinciden en agrupar los extractos con CL₅₀ inferiores a 100 µg/mL en las categorías de mayor toxicidad, mientras, los que muestran valores superiores a 1 000 µg/mL se clasifican como no tóxicos.^{12,13,15} Este estudio reveló la presencia de 17 extractos no tóxicos y 5 extractos con elevada toxicidad (clasificados como muy tóxicos o extremadamente tóxicos).

A. absinthium es una especie utilizada como antiparasitaria y antipirética, tanto en Cuba¹ como en otros países.¹⁶ Su elevada toxicidad frente a larvas de *A. salina* ya había sido reportada por otros autores cubanos, al evaluar un extracto diferente de esta planta.⁹ El extracto del presente estudio se evaluó con anterioridad frente a un panel de protozoos y células humanas sin mostrar acción selectiva alguna.¹⁷

M. leucadendron es utilizada para combatir infecciones.^{1,18} La acción antiprotozoaria y antifúngica de este extracto fue considerada inespecífica por causa de la citotoxicidad demostrada frente a células humanas.¹⁷

S. glauca pertenece a la familia Simaroubaceae, caracterizada por la presencia de cuasinoídes, cuya acción antimalárica,¹⁹ citotóxica¹⁹ y tóxica frente a larvas de *A. salina*^{11,20} ha sido bien

demostrada. El extracto del presente estudio no constituye una excepción al mostrar elevada toxicidad y citotoxicidad, lo cual hace del todo inespecífica su potente acción antiprotozoaria.¹⁷

Los extractos de *M. azedarach* y *L. cylindrica* no han sido evaluados previamente por su acción antiparasitaria o citotóxica. Sin embargo, es muy conocida la acción tóxica de la primera especie, en especial la ingestión de los frutos, por causa de la presencia de tetranortriterpenoides.^{1,21}

En general, los resultados del presente trabajo son favorables ante el hecho de que los extractos evaluados mostraron, mayoritariamente, baja toxicidad en este modelo. La elevada acción tóxica exhibida por los extractos de *A. absinthium*, *M. leucadendron*, *S. glauca*, *M. azedarach* y *L. cylindrica* hacen descartar la posibilidad de continuar estudios farmacológicos en esas especies.

Evaluation of toxicity of Cuban plant extracts with possible antiparasitic action based on the use of *Artemia salina* larvae

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Artemia salina* lethality assay is considered a useful tool to determine preliminary toxicity of plant extracts. In our labs some plant species are studied because of their antiparasitic potentials. OBJECTIVE: to evaluate *A. salina nauplii* mortality caused by ethanol extracts of Cuban medicinal plants. METHODS: *A. salina* larvae were exposed to four concentrations of 35 ethanol extracts from 34 plant species, for 24 hours. Mean Lethal Concentration (LC₅₀) was determined to classify each extract into the categories of extremely toxic, highly toxic, mildly toxic or non toxic. RESULTS: out of the tested extracts, only 5 (*Artemisia absinthium*, *Luffa cylindrica*, *Melia azedarach*, *Melaleuca leucadendron* and *Simarouba glauca*) were classified as extremely or highly toxic, 13 as mildly toxic whereas 17 extracts (48,5 %) were non toxic exhibiting LC₅₀ values over 1000 µg/mL. CONCLUSIONS: most of the evaluated extracts showed low toxicity, which is a positive result. The five extremely toxic extracts will not be included in further studies.

Key words: toxicity, plant extracts, *Artemia salina*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. 2ª ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1974.
2. Yajés R. Animal ethics committees and the implementation of the Three Rs. Animal alternatives, welfare and ethics. In: Van Zutphen LFM, Balls M, editors. Developments in Animal and Veterinary Sciences. Elsevier; 1997. p.367-71.
3. Michael AS, Thompson CG, Abramovitz M. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. Science. 1956;123:464.

4. Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. Proposal for a short term toxicity test with *Artemia* nauplii. *Ecotoxicol Env Safety*. 1981;5:382-87.
5. Sleet RB, Brendel K. Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia* nauplii for use in developmental toxicology. *Ecotoxicol Env Safety*. 1983;7:435-46.
6. Harwig J, Scott P. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Appl Microbiol*. 1971;21:1011-6.
7. Jaki B, Orjala J, Burji HR, Sticher O. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality and cytotoxicity. *Pharm Biol*. 1999;37:138-43.
8. McLaughlin JL, Chang CJ, Smith DL. Bench top bioassay for the discovery of bioactive natural products: an update. In: *Studies in Natural Products Chemistry*. AU Rahman Elsevier; 1991. p.383-409.
9. Lagarto A, Silva R, Guerra I, Iglesias L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. 2001;8(5):395-400.
10. Martínez M, Del ramo J, Torreblanca A, Díaz-Mayans J. Effect of cadmium exposure on Zinc levels in the brine shrimp *Artemia partenogenética*. *Aquaculture*. 1998;172:315-25.
11. Solís PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Plant Med*. 1993;59:250-2.
12. Valdés-Iglesias O, Díaz N, Cabranes Y, Acevedo ME, Arecos AJ, Graña L, et al. Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuente de extractos bioactivos. *Avicennia*. 2003;16:36-45.
13. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Plant Med*. 1982;45:31-4.
14. Mackeen MM, Ali AM, Lajis NH, Kawazu K, Hassan Z, Amran M, et al. Antimicrobial, antioxidant, anti-tumour-promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. Ex T. Anders. *J Ethnopharmacol*. 2000;72:395-402.
15. Sanabria-Galindo A, López SI, Gualdrón R. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Rev Col Cienc Quím Farm*. 1997;26:15-9.
16. Quinlan MB, Quinlan RJ, Nolan JM. Ethnophysiology and herbal treatments of intestinal worms in Dominica, West Indies. *J Ethnopharmacol*. 2002;80:75-83.
17. Fernández-Caliènes A, Mendiola J, Scull R, Vermeersch M, Cos P, Maes L. *In vitro* anti-microbial activity of the Cuban medicinal plants *Simarouba glauca* DC., *Melaleuca leucadendron* L. and *Artemisia absinthium* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(6):615-8.
18. Budhiraja SS, Cullum ME, Sioutis SS, Evangelista L, Habanova ST. Biological activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil component, terpenin-4-01, in human myelocytic cell line HL-60. *J Manipulative Physiol Ther*. 1999;22:447-53.
19. Nurhanan MY, Azimahtol Hawariah LP, Mohd Ilham A, Mohd Shukri MA. Cytotoxic effects of the root extracts of *Eurycoma longifolia* Jack. *Phytotherapy Res*. 2005;19:994-6.
20. Franssen FFJ, Smeijsters LJJW, Berger I, Medinilla Aldana BE. *In vivo* and *in vitro* antiplasmodial activities of some plants traditionally used in Guatemala against malaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:1500-3.
21. Phua DH, Tsai WJ, Ger J, Deng JF, Yang CC. Human *Melia azedarach* poisoning. *Clin Toxicol (Phila)*. 2008; 46(10):1067-70.

Recibido: 22 de junio de 2009. Aprobado: 16 de julio de 2009.
 Lic. Aymé Fernández-Caliènes. Laboratorio de Malaria, Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Autopista Novia del Mediodía Km 6 1/2. AP 601. Marianao 13. Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf.: 53-7-202-0650. Correo electrónico: ayme@ipk.sld.cu