

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM)

## Toxicidad de un extracto tánico de *Pinus caribaea* Morelet

MSc. Raiza Vega Montalvo,<sup>1</sup> MSc. Alicia Lagarto Parra,<sup>1</sup> MSc. Arilia García López,<sup>2</sup> Lic. Janet Piloto Ferrer,<sup>3</sup> Dr. Jorge L. Santana Romero<sup>4</sup> y Téc. Tatiana Gabilondo Ramírez<sup>5</sup>

### Resumen

Se determinó la toxicidad aguda oral, dérmica y toxicogenética de un polvo de taninos obtenido a partir de un extracto acuoso de la corteza de *Pinus caribaea* Morelet secado por *spray dry*. En todos los casos se emplearon ratas Wistar de ambos sexos y peso corporal entre 150 y 200 g. Se empleó el ensayo de dosis límite y aplicación cutánea de parche oclusivo durante 24 h, para determinar la toxicidad aguda oral y dérmica, respectivamente. El polvo fue administrado en dosis de 2 000 mg/kg en ambas ocasiones. Después de 14 días de observación, los animales fueron sacrificados para realizarles autopsia y examen macroscópico de órganos y tejidos. El estudio toxicogenético se realizó en un modelo *in vitro*: el sistema Salmonella/microsoma (Ames) y otro *in vivo*: el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón. En el ensayo de Ames se testaron las cepas TA 100, TA 98, TA 1535 y TA 1537 de *Salmonella typhimurium* con y sin activación metabólica en el rango de concentraciones de 50, 150, 500, 1 500 y 5 000 µg/placa. En el ensayo de inducción de micronúcleos se ensayaron dosis de 500, 1 000 y 2 000 mg/kg de peso corporal. Se comprobó que el polvo de taninos, obtenido a partir de un extracto acuoso de corteza de *Pinus caribaea* secado por *spray dry*, no es tóxico por administración oral y dérmica en los animales y es genotóxico *in vitro* e *in vivo*. Sería útil realizar otros estudios, con otras condiciones, para precisar la genotoxicidad de esta preparación.

**Palabras clave:** *Pinus caribaea* Morelet, taninos vegetales, toxicidad aguda oral, toxicidad aguda dérmica, ratas, sistema Salmonella/microsoma, micronúcleos, genotoxicidad.

Los taninos vegetales son metabolitos secundarios de las plantas, polifenoles de alto peso molecular que se caracterizan por formar complejos estables con las proteínas. Se encuentran divididos en 3 grandes grupos: taninos hidrolizables, condensados y complejos.<sup>1</sup> Los taninos de la especie *Pinus caribaea* Morelet, constituyen polifenoles del tipo taninos condensados proantocianidinas de origen floroglucinólicos, los cuales se caracterizan por una unión estable a proteínas, ADN y otros biopolímeros a pH 2.<sup>2</sup>

Se ha informado el estudio de los taninos como antivirales, fotoprotectores, antioxidantes, cicatrizantes, antimicrobianos e inhibidores de proteasas.<sup>3,4</sup> Otros autores los consideran como agentes cancerígenos debido a estudios realizados a trabajadores de un aserradero. La exposición constante a los residuos de la madera está asociada con el incremento del riesgo de adenocarcinoma en la cavidad nasal.<sup>5</sup>

Algunos autores han señalado la influencia que ejerce la ingestión de polifenoles y taninos, obtenidos a partir de fuentes naturales en la disminución de la concentración del colesterol del suero y su fracción de baja densidad, el aumento de la capacidad antioxidante y en general ante los eventos del organismo que involucran radicales libres, lo que contribuye a una reducción del índice aterogénico, una mayor protección de las enfermedades crónicas no transmisibles y una mejoría de la calidad de vida.<sup>6,7</sup>

Teniendo en cuenta las propiedades tóxicas y anticancerígenas reportadas de los taninos obtenidos de fuentes naturales, el objetivo de este trabajo se centró en la evaluación de la toxicidad aguda por vía oral y dérmica de extracto tánico mediante el ensayo de dosis límite y su estudio genotóxico en un modelo *in vitro*: el ensayo Salmonella/microsoma (Ames) y otro *in vivo*: el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón.

### Métodos

#### Material vegetal

Polvo de taninos obtenido a partir de un extracto acuoso de la corteza de *Pinus caribaea* Morelet secado por *spray dryer* y proveniente del Instituto Superior de Ciencias y Tecnología Nucleares.

### **Propiedades organolépticas**

Color: carmelita.

Olor: característico a madera.

Textura: polvo seco fino.

Sabor: amargo.

### **Análisis químico**

Cuantificación de taninos totales: 41,2 %.

Sustancias relacionadas: ninguna.

Producto higroscópico: dependiendo de la conservación puede hidratarse con facilidad hasta un 12 – 15 % de humedad.

Solubilidad: en agua forma disoluciones coloidales con facilidad, posible formación de partículas insolubles, nula en solventes apolares, parcial en etanol y acetona.

Contenido de metales ( $\mu\text{g/g}$ ): Ni < 0,5; Zn : 21, Fe: 129; Cu: 8; Cr < 3; Cd < 1,5, Co < 0,5.

### **Ensayo de toxicidad aguda oral**

Debido a la posible inocuidad de la sustancia de ensayo se procedió a realizar el ensayo límite regulado por la OECD en su norma N° 423 (OECD Guideline For Testing Of Chemical “Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method” N° 423, 1996).

En la determinación de la toxicidad aguda del extracto tánico se emplearon ratas Wistar, masa corporal entre 150 y 200 g procedentes de la colonia del Laboratorio Control Biológico del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), los cuales fueron mantenidos en una habitación a temperatura controlada de  $20 \pm 2^\circ \text{C}$  y humedad de 55-70 %, ciclo luz /oscuridad de 12-12 h. La alimentación consistió en ratonina en forma de pelotillas (CM 01000) proveniente del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) y agua a voluntad.

Se confeccionaron 2 grupos de 3 animales de ambos sexos. Todos fueron identificados para la dosificación exacta de acuerdo a su peso corporal mediante un sistema de marcaje con ácido pícrico.

La sustancia se administró a una dosis de 2 000 mg/kg para lo cual se pesaron 2,5 g del polvo que se suspendieron en 25 mL de agua destilada. Dieciséis horas antes de la administración de la sustancia se le retiró la comida a todos los animales y esta se realizó por vía oral mediante cánula intragástrica.

### **Ensayo de toxicidad aguda dérmica**

El ensayo se realizó según lo establecido en la norma N° 402 de la OECD (OECD Guideline For Testing Of Chemical “Acute Dermal Toxicity” N° 402, 1987).

Se utilizaron ratas albinas Wistar de ambos sexos, con una masa corporal comprendida entre 200 y 300 g. Para cada grupo de ensayo se seleccionaron 5 animales de cada sexo, los que fueron mantenidos en jaulas individuales a una temperatura controlada de  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ , humedad de 55-70 % y ciclos luz-oscuridad 12-12 h. La alimentación consistió en ratonina en forma de pelotillas (CM 01000) proveniente del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) y agua a voluntad.

En las 24 h previas al estudio, los animales fueron depilados en el área dorsal del tronco aproximadamente el 10 % de la superficie corporal total (4 x 5 cm). El día del ensayo la sustancia fue aplicada uniformemente en el área depilada de los animales. Esta se preparó al 10 % en solución NaCl 0,9 % y se administró con un factor volumen de 0,02 mL/g, lo que se corresponde con una dosis de 2 000 mg/kg. La sustancia fue mantenida en contacto con la piel durante 24 h con la ayuda de un parche oclusivo.

## Registros

Para registrar cualquier síntoma tóxico, los animales fueron observados, en ambos ensayos, constantemente durante las primeras 24 h y diariamente durante un período de 14 días. Al finalizar este tiempo se procedió a la eutanasia por narcosis para realizar el examen macroscópico minucioso de órganos y tejidos.

El peso corporal se registró al inicio, a los 7 días y al final del experimento.

## Análisis estadístico

Los datos del peso corporal fueron procesados mediante un análisis de varianza de una vía y una prueba de Duncan posteriormente.

## Ensayo de Salmonella/microsoma (Ames)

Se empleó una batería de 4 cepas de *Salmonella typhimurium*, TA-1535, TA-1537, TA-98 y TA-100, donadas por el Dr. Bruce N. Ames (Universidad de California en Berkeley, EUA). Se empleó el método de incorporación en placa con un protocolo de trabajo bien estandarizado.<sup>8</sup> Se ensayaron concentraciones de 50, 150, 500, 1500, y 5000 µg/placa de sólidos totales, sembrándose 3 placas por concentración. Se utilizaron diferentes controles positivos en dependencia de la cepa y la presencia o no de la activación metabólica exógena. La misma contenía 10 % de fracción S9 en solución de co-factores, obtenida a partir de hígado de ratas tratadas con fenobarbital y 5,6 naftoflavona.<sup>9,10</sup> Las placas se incubaron a 37° C y se contaron las colonias revertantes a las 48 h. Para el análisis estadístico se aplicó el programa SALANAL (Salmonella Assay Analysis. Versión 1. US Environmental Protection Agency).

## Ensayo de inducción de micronúcleos

Se pesaron 2 000 mg del extracto tánico y se disolvieron en 10 mL de agua destilada estéril para obtener una concentración de 200 mg/mL de sólidos totales en el momento de la administración a los animales.

Se emplearon ratones albinos de la línea no isogénica Suizo, procedentes del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM, con un peso promedio de  $21,8 \pm 1,6$  g y con 5 semanas de nacidos. Previo al experimento, los animales se sometieron a un período de adaptación de una semana en condiciones de temperatura y humedad convencionales. La alimentación consistió en ración en forma de pelotillas y agua sin restricción. Se establecieron 5 grupos experimentales: control negativo (agua destilada), un control positivo (mitomicina C, 2 mg/kg en dosis única, 24 h antes del sacrificio) y 3 dosis (500, 1 000 y 2 000 mg/kg).<sup>11-13</sup>

Cada grupo estuvo representado por 10 animales, 5 de cada sexo. La vía de administración fue oral a razón de 10 mL/kg en dosis separadas por 24 h. El sacrificio de los animales, el muestreo, procesamiento y evaluación de las extensiones de médula ósea se realizó de acuerdo a la metodología establecida.<sup>14</sup> El análisis estadístico se llevó a cabo aplicando la transformación  $\sqrt{X + 1}$  al porcentaje de eritrocitos policromáticos micronucleados (% MPCE) y posteriormente se aplicó un ANOVA simple para los ratones machos y hembras.

## Resultados

### Ensayo de toxicidad aguda oral

No se observaron síntomas tóxicos a la dosis administrada, tampoco se presentó mortalidad en el período de observación, ni decremento en el peso corporal en ninguno de los grupos experimentales durante el estudio (figura 1). El análisis estadístico del peso corporal de los animales registrado al día 7 y 14 con respecto al inicial mostró un aumento significativo ( $p < 0,05$ ).

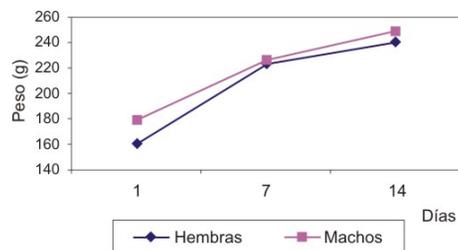


Fig.1. Comportamiento del peso corporal durante el estudio de toxicidad aguda oral.

### Ensayo de toxicidad aguda dérmica

Al administrar la sustancia de ensayo no se observó la presencia de síntomas tóxicos en los animales y al retirar el parche no se encontraron alteraciones en la piel. No se presentó mortalidad en el período de observación y el peso corporal mostró un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) (figura 2).

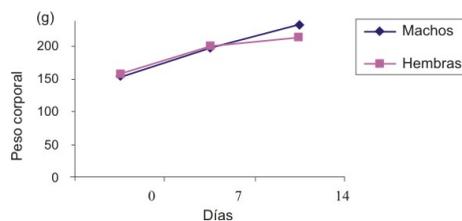


Fig.2. Comportamiento del peso corporal durante el estudio de la toxicidad aguda dérmica.

En ambos ensayos no se encontraron alteraciones patológicas en los órganos analizados al realizar la autopsia.

### Ensayo de Ames

Los resultados se muestran en la tabla 1:

Tabla 1. Resultados del ensayo de Ames para las diferentes cepas frente al extracto tánico

	Cepa TA 1535		Cepa TA 1537		Cepa TA 98		Cepa TA 100	
	- S9	+S9	- S9	+S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
$\mu\text{g/placa}$	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD
0	19,67 $\pm$ 3,79	27,67 $\pm$ 4,16	6,33 $\pm$ 1,53	10,67 $\pm$ 3,06	26,33 $\pm$ 4,16	32,33 $\pm$ 33	165,33 $\pm$ 13,61	165,33 $\pm$ 5,03
50	20,67 $\pm$ 0,58	20,67 $\pm$ 5,03	8,67 $\pm$ 5,69	12,33 $\pm$ 5,03	34,33 $\pm$ 4,51	45,00 $\pm$ 12,17	189,67 $\pm$ 13,61	182,67 $\pm$ 16,01

150	25,33 ± 5,69	24,33 ± 14,74	9,00 ± 3,61	10,00 ± 3,61	25,00 ± 9,54	38,33 ± 11,15	148,67 ± 38,02	213,33 ± 15,28*
500	22,00 ± 4,36	24,33 ± 3,79	10,33 ± 1,53	14,67 ± 6,43	48,33 ± 13,65	67,33 ± 0,58	194,67 ± 5,51	230,00 ± 26,46*
1 500	29,00 ± 6,24	21,33 ± 1,15	21,33 ± 12,34	33,67 ± 4,04*	75,67 ± 4,93**	120,33 ± 29,50*	213,00 ± 14,73*	232,33 ± 17,50*
5 000	16,00 ± 10,54	17,00 ± 4,58	15,67 ± 5,51	33,00 ± 10,00*	125,00 ± 25,00**	213,33 ± 32,15**	242,66 ± 19,25*	330,33 ± 41,43**
Control positivo <sup>1</sup>	773,66 ± 50,4	867,5 ± 2,50	563,33 ± 23,21	554,66 ± 41,1	1333,33 ± 377,12	2000 ± 0,0	1253,33 ± 335,19	672 ± 124,1
p-value	0,305	0,489	0,095	0,012	< 0,001	< 0,001	0,004	< 0,001

cepa	Cepa TA 1535	Cepa TA 1537	Cepa TA 98	Cepa TA 100
- S9	Azida de sodio: 1,5 µg/p	9 Aminoacridina: 100 µg/p	Ácido picrolónico: 100 µg/p	Azida de sodio: 1,5 µg/p
+ S9	Ciclofosfamida: 500 µg/p	2 Aminoantraceno: 2 µg/p	2 Aminofluoreno: 10 µg/p	Benzo α-pireno : 10 µg/p

### Ensayo de inducción de micronúcleos

Los resultados se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Resultados experimentales del ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón frente al extracto tánico

Dosis (mg/kg)	Sexo <sup>a</sup>	PCE/NCE <sup>b</sup> (media ± DS)	MNPCE/2000 PCE <sup>c</sup> (media ± DS)
Agua destilada <sup>d</sup>	M	3,48 ± 1,40	0,35 ± 0,15
	F	3,68 ± 1,06	0,26 ± 0,15
500	M	2,74 ± 0,89	0,66 ± 0,11**
	F	3,27 ± 1,44	0,55 ± 0,08**

1 000	M	4,91 ± 2,50	0,41 ± 0,15**
	F	2,78 ± 1,36	1,01 ± 0,51**
2 000	M	10,1 ± 6,04	0,59 ± 0,37**
	F	2,01 ± 0,78	0,81 ± 0,25**
CPe	M	2,03 ± 1,14	1,28 ± 0,19**
	F	3,02 ± 0,56	1,44 ± 0,49**
FE <sup>f</sup>	M	1,71 ± 0,03	0,14 ± 0,05
	F	1,72 ± 0,05	0,13 ± 0,04

- a. M: machos, H: hembras. \*\* $p < 0,01$
- b. Relación eritrocitos policromáticos/ eritrocitos normocromáticos.
- c. Eritrocitos policromáticos micronucleados en PCE total.
- d. Control negativo. e. Control positivo: Mitomicina C (2 mg/kg).
- f. Animales no tratados.
- Prueba de Cochran- Armitage:  
 Machos  $p = 0,00021$   
 Hembras  $p = 2,2 \times 10^{-7}$

## Discusión

El extracto de taninos se consideró no tóxico atendiendo a los resultados del ensayo de dosis límite realizado por vía oral y dérmica, no provocó mortalidad ni signos de toxicidad. De acuerdo al sistema de las clases de toxicidad de la Comunidad Europea, el extracto empleado se enmarcó en el rango de no clasificado por presentar una  $DL_{50}$  mayor que 2 000 mg/kg.<sup>15</sup>

Sin embargo en el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón, la relación PCE/NCE indicadora de toxicidad medular no mostró diferencias significativas (machos  $p = 0,04$ , hembras  $p = 0,17$ ); el valor de PCE micronucleados (MNPCE) presentó diferencias significativas respecto al control negativo (machos  $p = 4,9 \times 10^{-4}$ , hembras  $p = 6,6 \times 10^{-3}$ ) y la prueba de tendencias lineales Cochran-Armitage presentó diferencias significativas entre machos ( $p = 0,00021$ ) y hembras ( $p = 2,2 \times 10^{-7}$ ), por lo que se consideró positivo el resultado de ese ensayo.

Se consideró positivo además el ensayo de Salmonella/microsoma ya que existieron diferencias significativas con respecto al control negativo y efecto dosis respuesta para las cepas TA 98 con activación metabólica y sin activación metabólica, y para la cepa TA 100 con activación metabólica, criterios establecidos por las agencias internacionales para considerar este ensayo como positivo.

Se puede concluir que el extracto tánico ensayado se considera no tóxico atendiendo a los resultados del ensayo de dosis límite realizado por vía oral y dérmica y es genotóxico

frente a los ensayos de Salmonella/microsoma y de Inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón. Sería útil realizar otros estudios, con otras condiciones, para precisar la genotoxicidad de esta preparación.

## Summary

### Toxicity of a tannin extract from *Pinus caribaea* Morelet

Acute oral, dermal and toxicogenetic toxicity of a spray dry-dried tannin powder from an aqueous extract of the wood of *Pinus caribaea* Morelet was determined. For all cases, Wistar rats of both sexes weighing 150-200g were used. Limit dose test and application of an occlusive patch on the skin for 24 hours determined the acute oral and dermal toxicities, respectively. The powder was administered at a dose of 2 000 mg/kg in both occasions. After 14 day-observation, the animals were killed to make autopsy and macroscopic test of organs and tissues. The toxicogenetic study was carried out in *in vitro* model called Salmonella/microsome system(Ames) and *in vivo* model, that is, the micronucleus induction test in the mouse bone marrow. In Ames test, strains TA 100, TA 98, TA 1535 and TA 1537 of *Salmonella typhimurium* with and without metabolic activation in the range of 50, 150, 500, 1 500 and 5 000 mg/plate concentrations were analyzed. Doses of 500, 1 000 and 2 000 mg/kg of body weight were tested in the micronuclei induction test. It was proved that the spray dry-dried tannin powder obtained from an aqueous extract of the wood of *Pinus caribaea* is not toxic by oral and dermal administration in the animals but it is genotoxic *in vitro* and *in vivo*. It will be advisable to perform other studies under different conditions so as to exactly determine the genotoxicity of this extract.

**Key words:** *Pinus caribaea* Morelet, vegetable tanins, acute oral toxicity, acute dermal toxicity, rats, Salmonella/microsome system, micronuclei, genotoxicity.

## Referencias bibliográficas

1. Okuda T, Yoshida T, Hatano T. Oligomeric hydrolyzable tannins, a new class of plant polyphenol. *Heterocycles*. 1990;30:202-7.
2. Martínez Luzardo F. Obtención, caracterización general y uso industrial de taninos vegetales contenidos en la corteza de cinco especies forestales que crecen en Cuba [tesis]. La Habana: Centro Nacional de Investigaciones Científicas; 1990.
3. Fukushi K, Sakagami H, Okuda T, Hatano T, Kitajita K. Tannins as anticancer agents. *Anticancer Res*. 1989;9:313-8.
4. Santana JL, Peña M, González S. Evaluation of antimicrobial, antielastase and photoprotective activity of vegetable tannins and derivatives. *Contribución a la Educación y a la Protección ambiental*. 1999:100-5.
5. Keshava N, Ong T. Occupational exposure to genotoxic agents. *Mutat Res*. 1999;437:175-94.
6. Saduka Y, Sugiyama T, Hirota S. Modulation of cancer chemotherapy by Green tea. *Clin Cancer Res*. 1998;4:153-6.
7. Whitehead T, Robinson D, Allaway S, Syms J, Hale A. Effect of red wine ingestion on antioxidant capacity of serum. *Clin Chem*. 1995;41(1):332-5.
8. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*. 2000;455:29-60.
9. Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, Matsushima T, et al. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutat Res*. 1994;312:217-33.
10. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res*. 1983;113:173-215.
11. Hayashi M. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res*. 1994;312:293-304.
12. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M. Micronuclei as an Index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutagen*. 1991;18:277-91.

Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MS, Salomone MF, Heddle J. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US EPA Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 1990;239:29-80.

14. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. En: Hollaender A, editor. *Chemical Mutagens. Principles and Methods for their detection.* New York: Plenum; 1976. p. 31-53.
15. Commission of the European Communities: Annex to Commission Directive 92/69/EEC of 31 July 1992 adapting to technical progress for the seventeenth time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. B.1 Acute toxicity (oral). *Off J Eur Comm (L 383 A).* 1992;35:110-2.

Recibido: 8 de noviembre de 2004. Aprobado: 22 de julio de 2005.

MSc. *Raiza Vega Montalvo*. CIDEM. Ave 26 No. 1605 e/ Calzada Ptes. Grandes y Ave. Indendencia. Plaza de La Revolución. La Habana, Cuba.

e-mail: [cidem@infomed.sld.cu](mailto:cidem@infomed.sld.cu)

<sup>1</sup> **Licenciada en Farmacia.**

<sup>2</sup> **Licenciada en Microbiología.**

<sup>3</sup> **Licenciada en Biología.**

<sup>4</sup> **Profesor Auxiliar.**

<sup>5</sup> **Técnico en Farmacia.**