

Laboratorio Central de Farmacología (LCF) y Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM)

Evaluación tóxica y genotóxica del extracto fluido de *Ocimum gratissimum* L.

Dra. Neylim Blanco Hernández,¹ Lic. Alberto Ramos Ruiz² y Lic. Ángel Vizoso Parra³

RESUMEN

Se evaluó la toxicidad aguda y la actividad genotóxica del extracto fluido de hojas de *Ocimum gratissimum* L. a través de 2 sistemas de ensayo a corto plazo, uno *in vitro* con la cepa D-30 de *Aspergillus nidulans* y otro *in vivo*, el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón. La toxicidad aguda del extracto quedó demostrada por la mortalidad observada que alcanzó el 50 % de los animales en la dosis 3g/kg, que fue dosis dependiente. Se encontró una respuesta genotóxica poco acentuada del extracto fluido al 30 % de *O. gratissimum*. Los resultados permitieron concluir que este extracto mostró efectos tóxicos agudos y signos histológicos de hepatotoxicidad y nefrotoxicidad y no resultó genotóxico sobre la cepa D-30 de *Aspergillus nidulans* en el ensayo de segregación mitótica y tampoco en el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón.

Palabras clave: *Ocimum gratissimum* L., orégano cimarrón, *Aspergillus nidulans*, ensayo de micronúcleos, toxicidad aguda, genotoxicidad.

El Programa Nacional de Medicina Tradicional cuenta entre sus objetivos evaluar científicamente la efectividad e inocuidad de las plantas e incorporar a la medicina actual sus propiedades terapéuticas para, finalmente, incrementar la disponibilidad de productos farmacéuticos. Esto señala la importancia de la evaluación farmacológica de diferentes especies, no sólo para comprobar los efectos descritos en la literatura, en las condiciones propias del país, sino también para encontrar nuevas especies con propiedades curativas.¹

En correspondencia con la evaluación farmacológica de las plantas medicinales se encuentra su estudio toxicológico que permite rechazar o avalar la continuidad del proceso investigativo y el uso de un medicamento herbario, ya que es preciso que este sea acertadamente utilizado desde el punto de vista farmacológico y además con un mínimo de efectos tóxicos para el individuo.²

Ocimum gratissimum L., perteneciente a la familia Lamiaceae, es una planta arbustiva de hasta 3 metros de altura, sus hojas son ovado-elípticas y miden entre 5 y 12 cm de largo. Presenta espigas de 10 y 15 cm de longitud y semillas pequeñas y subglobosas.^{3,4} En Cuba se le conoce comúnmente como orégano cimarrón, albahaca cimarrona, albahaca de clavo, clavo canela; se distribuye ampliamente en todas las provincias, preferentemente en las faldas de las lomas calcáreas.⁵ La planta crece también en otros países caribeños donde es igualmente empleada con fines medicinales.⁴

Entre los usos que se le señalan están: en el tratamiento del reumatismo, los dolores abdominales y la flatulencia. También se utiliza como antigripal, "febrífugo",

antidiarreico carminativo y para las afecciones oculares y auriculares.^{4,6} En general, se emplea en decocciones de las hojas y en algunos casos de la raíz, a la que se le atribuye propiedades diuréticas.⁵

Desde el punto de vista fitoquímico, las hojas y las raíces contienen alcaloides, esteroides, terpenoides, quinonas, flavonoides, saponósidos, compuestos fenólicos y taninos. Varias fuentes coinciden en que su aceite contiene timol, eugenol y citral, oscilando la cantidad de eugenol entre 45 y 70 %.^{4,6-8} Ha sido comprobada su actividad antimicrobiana y antifúngica *in vitro* en diferentes condiciones experimentales.^{4,6,9,10}

Le han sido demostradas propiedades antihelmínticas, estimulantes, anestésicas y antiespasmódicas.^{4,8,11}

Se registra que fracciones de *O. gratissimum* aisladas por cromatografía, contienen un componente de acción contráctil sobre los músculos lisos intestinales y vascular.¹²

Teniendo en cuenta la amplia utilización de la planta por la población cubana, la que se sirve de las propiedades que se le atribuyen tradicionalmente, algunas de las cuales han sido comprobadas de forma experimental y que además existe escasa información acerca de sus efectos tóxicos; los autores se propusieron evaluar la toxicidad aguda del extracto fluido de *O. gratissimum* mediante el modelo clásico de determinación de LD₅₀ en roedores, así como precisar si resulta genotóxico en los ensayos de segregación mitótica en *Aspergillus nidulans* y de micronúcleos en médula ósea de ratón.

MÉTODOS

Material vegetal y elaboración del extracto

O. gratissimum se cultivó en la Estación Experimental de Plantas Medicinales “Dr. Juan Tomás Roig”, una muestra convenientemente clasificada se encuentra en el herbario de dicha institución con número ROIG 0132. A partir de sus hojas secas se preparó un extracto fluido al 30 % en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) según las normas vigentes.¹³ El extracto contenía el 25,53 % de etanol, 12 % de sólidos totales y 0,035 % de aceite esencial. Tenía un pH de 5,95, densidad relativa de 1,0295 e índice de refracción de 1,3625.

Estudio de toxicidad aguda (LD₅₀)

Se emplearon ratones albinos de la línea no isogénica Suizos, procedentes del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM. Los animales recibieron dieta consistente en pienso en pelotillas, ratonina y agua *ad libitum* y se mantuvieron en condiciones de humedad y temperatura convencionales. Al comienzo del experimento tenían un peso promedio de $21,5 \pm 3,2$ g.

Se establecieron 6 grupos de 10 animales cada uno (5 de cada sexo): animales centinelas (no tratados), control negativo (etanol 25 %) y 4 dosis: 0,75; 1,00; 2,00 y 3,00 g de sólidos totales/kg de peso corporal (equivalentes a 0,25; 8,33; 16,66 y 24,99 g de material vegetal seco/kg), las cuales fueron administradas de forma única por la vía oral (p.o). Los animales fueron observados durante los 14 días posteriores a la administración del extracto, se pesaron antes del tratamiento, a los 7 días y al final del

mismo. Transcurridos 15 días se tomaron al azar 2 animales por cada grupo, una hembra y un macho, a los cuales se les realizó una laparotomía para la observación macroscópica y estudio histológico de los diferentes órganos.

Estudios de genotoxicidad

*Ensayo de segregación mitótica en *Aspergillus nidulans**

Se empleó la cepa diploide D-30,¹⁴ obtenida de los haploides A593 y A594 procedentes del Fungal Genetics Stock Center (FGSC) en Atlanta, EE.UU. La cepa se conservó en medio mínimo a 4 °C.

En el experimento se empleó medio completo (MC) según lo descrito al respecto.¹⁵ Para determinar el rango de concentraciones a probar se realizó un ensayo piloto de toxicidad. Se escogieron 5 concentraciones (0,4; 0,8; 1,2; 1,8 y 2,4 mg de sólidos totales/mL de MC) pues en el extremo superior de este rango se observó toxicidad irremediable y fue posible contar con precisión los sectores coloreados por colonias. Se tuvo en cuenta el contenido máximo de alcohol permisible, el cual fue de hasta el 2 %.¹⁶ Se prepararon grupos de 14 placas de MC con las concentraciones elegidas, un control de frecuencia espontánea, un control negativo (solvente) y un control positivo (metil metano sulfonato 2,4 mM). Se inocularon las placas con conidios de la cepa en punto al centro y se incubaron a 37 °C entre 6 y 10 días hasta que la colonia cubriera totalmente la placa.¹⁵

A las 72 h de la siembra se evaluó la toxicidad cuantitativa, que se expresó como el porcentaje de reducción del crecimiento lineal de la colonia respecto al control negativo. La toxicidad cuantitativa se clasificó de acuerdo al criterio de *Kappas*, que plantea que un índice de toxicidad menor de 15 % indica una baja toxicidad, mientras que índices entre 16 y 30 % y mayores de 30 % apuntan hacia toxicidades media y alta respectivamente.¹⁷ Concluido el tiempo de incubación se evaluó la genotoxicidad en términos de la frecuencia de sectores aparecidos en cada colonia y observados para cada concentración.¹⁸ Se determinó el Índice de Segregación Mitótica Inducida (ISMI), definido como la razón entre la frecuencia (promedio) de sectores por colonia (FSC) para cada una de las concentraciones ensayadas respecto a la obtenida para el control negativo. El experimento se realizó 2 veces.

Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón

Se establecieron 6 grupos de 10 animales cada uno (5 de cada sexo), seleccionados al azar: control negativo (solvente), control positivo (ciclofosfamida), control de frecuencia espontánea (no tratados) y 3 grupos tratados con dosis de 2,4; 1,2 y 0,6 g de sólidos totales/kg (equivalentes a 20,0; 10,0 y 5,0 g de material vegetal seco/kg) en un volumen de 20 ml/kg por vía oral. Al control negativo se le administró etanol al 25 % en igual volumen. El esquema de tratamiento consistió en 2 administraciones separadas por un intervalo de 24 h y sacrificio después de la última aplicación.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se procedió a la extracción de ambos fémures y al lavado de la cavidad medular como lo describe la técnica.¹⁹ Se prepararon 2 láminas por animal que fueron codificadas siguiendo una tabla de números aleatorios. Se contaron al menos 1 000 eritrocitos policromáticos (PCE) por animal y

además los eritrocitos normocromáticos (NCE) presentes por cada 250 PCE para estimar la relación PCE/NCE, indicadora de citotoxicidad medular.

Se empleó el número mínimo de animales posible según las recomendaciones técnicas del experimento y fueron manipulados respetando las normas establecidas para la protección de los mismos.

Cálculo de la LD₅₀ y análisis estadístico

Para la determinación de la LD₅₀ los datos fueron transformados a probits y plotados contra los logaritmos de las concentraciones. Luego se estableció la relación lineal a través del método de los mínimos cuadrados.²⁰

Para el ensayo de segregación mitótica en *Aspergillus nidulans*, el análisis estadístico se realizó normalizando los conteos de sectores segregantes por colonia mediante la transformación $\sqrt{(x+0,5)}$ antes de proceder a un análisis de varianza de 1 vía que permitió comparar las frecuencias de sectores por colonia (FSC) de las diferentes concentraciones ensayadas con el control negativo.

En el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón, los datos de PCE/NCE y porcentaje de PCE micronucleados se normalizaron empleando la transformación $\sqrt{(x+1)}$. Después se procedió a realizar un análisis de varianza de 2 vías considerando sexo y tratamientos tanto para la relación PCE/NCE como para el porcentaje de PCE micronucleados.

Las comparaciones entre controles y tratamientos de interés, en todas las ocasiones, se realizaron utilizando las pruebas t de *Student* y de *Dunnett*.²¹ La existencia de una posible relación dosis-respuesta se chequeó a través del análisis de regresión de *Cochran-Armitage* para tendencias lineales en proporciones.²² Se trabajó con un nivel de significación $p < 0,05$.

RESULTADOS

Estudio de toxicidad aguda

Entre 1 y 2 min después de la ingestión comenzó a apreciarse disminución de la actividad motora, de intensidad creciente en correspondencia con el aumento de la dosis, marcha atáxica, arrastre del tren posterior y ausencia del reflejo de enderezamiento en el rango de dosis de 1 a 3 g/kg, además aumento de la frecuencia respiratoria seguido de períodos de apnea y muerte. Ocurrieron 11 muertes en las primeras 24 h, el cálculo dio un valor de LD₅₀ de 3,2 g de sólidos totales/kg (equivalente a 26,66 g de material vegetal seco/kg).

En el estudio macroscópico se visualizaron segmentos de duodeno moderadamente hemorrágicos en los animales de la dosis 3 g/kg y palidez renal en el rango de 1 a 3 g/kg.

En el estudio microscópico de los segmentos del tubo digestivo, no se demostraron alteraciones histológicas. Se comprobaron signos de hepatotoxicidad y nefrotoxicidad en todas las muestras de animales tratados con diferentes dosis.

Ensayo de segregación mitótica en Aspergillus nidulans

Se observó una toxicidad cuantitativa baja y un incremento de la FSC estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en todo el rango de concentraciones ensayadas, no obstante la FSC nunca llega a sobrepasar el doble de la frecuencia espontánea por lo que se trata de un efecto débil. El análisis de regresión lineal no indicó la existencia de relación dosis-respuesta estadísticamente significativa.

Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón

No se detectaron alteraciones en la relación PCE/NCE, indicadora de citotoxicidad medular, tampoco la frecuencia de PCE micronucleados fue significativa. La prueba de regresión de *Cochran-Armitage* para comprobar relación dosis-respuesta también resultó negativa ($p=0,43$).

DISCUSIÓN

La toxicidad aguda del extracto quedó demostrada por la mortalidad observada que alcanzó el 50 % de los animales en la dosis 3g/kg, que fue dosis dependiente. Las alteraciones histológicas que señalaron efectos hepatotóxicos y nefrotóxicos fueron atribuibles al extracto. La hiperemia del duodeno encontrada en los animales que recibieron las dosis superiores, pudiera corresponderse con un efecto irritante local del extracto relacionado con la dosis.

El balonamiento marcado de los hepatocitos y las áreas dispersas de necrosis focal observadas en todas las muestras correspondientes a los animales tratados indicaron una afectación hepatocelular debida al extracto fluido de *O. gratissimum*, sin embargo, el hallazgo de un infiltrado inflamatorio periportal ligero y necrosis de células aisladas, así como la vacuolización hidrópica de los hepatocitos son cambios reversibles propios de una hepatopatía alcohólica en estadio agudo.²³ La descamación del epitelio del túbulo contorneado proximal pudiera corresponderse con la acción de un agente tóxico sobre las células tubulares renales que experimentó reabsorción activa a este nivel, mientras que la congestión intersticial ligera advertida en todas las muestras de riñón, incluidas las correspondientes al control negativo y con excepción del grupo control, se pudiera atribuir al efecto del etanol.

En el ensayo de segregación mitótica en *Aspergillus nidulans*, a partir de la concentración de 1,8 mg/mL se observó toxicidad cuantitativa baja, esta citotoxicidad pudiera estar relacionada con las propiedades fungicidas y bactericidas comprobadas para el aceite esencial de la planta que se conoce es rico en timol y eugenol, sustancias en las que también se comprobaron estas acciones.^{4,5,9,10} Existió una estrecha relación entre la acción de algunos compuestos antifúngicos y la respuesta genotóxica observada para ellos en esta prueba, que vincula su toxicidad celular a la interferencia con mecanismos hereditarios.¹⁶ En correspondencia con la toxicidad observada sobre el hongo, también apareció un aumento en la FSC desde la menor concentración ensayada, en general fue un efecto débil con una tendencia dosis-dependiente poco pronunciada, no fue posible analizar este efecto a concentraciones superiores debido a que se afectaba la visualización de los sectores segregantes por la propia citotoxicidad del extracto. Otro factor que pudiera haber influido en una respuesta genotóxica poco acentuada fue la ausencia de un sistema de activación metabólica exógena, por otra parte, las

preparaciones de origen vegetal constituyen mezclas muy complejas de diversas sustancias en las que es usual encontrar componentes con propiedades antimutagénicas como la clorofila y los carotenoides que podrían debilitar el efecto genotóxico de otros presentes en el extracto.

El ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón resultó negativo a dosis tan altas como la correspondiente al 80 % de la LD₅₀ calculada; teniendo en cuenta la existencia de efectos sistémicos en ese rango de dosis, podría pensarse que el extracto fluido al 30 % de *O. gratissimum* se trata de una mezcla donde, o bien no existen componentes de acción mutagénica, o de existir estos, no se encuentran en las concentraciones críticas para que ejerzan su efecto. También es preciso considerar la existencia de condiciones propias de la fisiología animal como son los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción, de manera que el presunto componente genotóxico podría ser inactivado por diferentes sistemas enzimáticos, entre ellos el hepático, y por tanto incapaz de desencadenar daño a nivel del ADN en el órgano diana. Otros fenómenos como una absorción intestinal deficiente así como una excreción preferencial de estos compuestos tóxicos podrían contribuir a la atenuación de la respuesta *in vivo*.

Se puede concluir que el extracto fluido al 30 % de *O. gratissimum* mostró efectos tóxicos agudos y signos histológicos de hepatotoxicidad y nefrotoxicidad y no resultó genotóxico sobre la cepa D-30 de *Aspergillus nidulans* en el ensayo de segregación mitótica y tampoco en el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón.

SUMMARY

Toxic and genotoxic evaluation of the fluid extract from *Ocimum gratissimum* L.

The acute toxicity and the genotoxic activity of the fluid extract of leaves of *Ocimum gratissimum* L. were evaluated by two short-term assay systems, one *in vitro* with the strain D-30 from *Aspergillus nidulans*, and another *in vivo*, the micronucleus test in mouse bone marrow. The acute toxicity of the extract was proved by the mortality observed that rose to 50 % in the 3g/kg dose, which was dose dependant. It was found a little accentuated genotoxic response of the fluid extract of *O. gratissimum* 30 %. The results allowed to conclude that this extract showed acute toxic effects and histologic signs of hepatotoxicity and nephrotoxicity. It was not genotoxic neither for the strain D-30 from *Aspergillus nidulans* in the mitotic segregation test, nor in the micronucleus test in mouse bone marrow.

Key words: *Ocimum gratissimum* L, *Aspergillus nidulans* , micronuclei test, acute toxicity, genotoxicity.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Comisión Asesora de Investigación. Guía metodológica para la investigación de plantas medicinales. La Habana: MINSAP;1994.
2. Buenas Prácticas de Laboratorio en Toxicología. Centro Nacional de Toxicología: MINSAP;1994.
3. Plantas medicinales aromáticas venenosas y de otros usos de la provincia de Pinar del Río TII. La Habana: editorial Academia;1986.p.26-64 (Grupo

- Polivalente de Plantas Medicinales adscrito al Consejo Científico Asesor Prov. de P. del Río).
4. Robineau L. Hacia una farmacopea caribeña. Santo Domingo: Enda-Caribe;1991.p. 475.
 5. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. 2da ed. La Habana: Editorial Científico Técnica;1988.p.262-3 (Parte I).
 6. Dumblynton C. Medicinal plants in Viet Nam. England: WHO, Institute of Materia Medica Hanoi;1990.p.263.
 7. Demissew S. A description of some essential oil bearing plants in Ethiopia and their indigenous uses. J Essential Oil Res. 1993;5(5):465-9.
 8. Granda M, Fuentes V. Estudios fisiológicos en plantas medicinales IV. Rev Cubana Farm. 1986;20(1):44-9.
 9. Janssen AM, Schaffer JJC, Ntezurubanza L, Suendsen AB. Antimicrobial activities of some *Ocimum* species grown in Rwanda. J Ethnopharm. 1989;26(1):57-93.
 10. Dixit V, Shukla K. Evaluation of essential oil of *Ocimum gratissimum* against storage fungic. Indian Perfumer. 1992;36(4):277-83.
 11. Lioger HA. Plantas medicinales de Puerto Rico y del Caribe. San Juan: Iberoamericana de Ediciones;1990.p.566.
 12. Onajohi FD. Smooth muscle contracting lipid-soluble principles in chromatographic fraction of *Ocimum gratissimum*. J Ethnopharm. 1986;18(1):12-3.
 13. Soler B, Méndez G, García M, Miranda M. Normas Ramales. Medicamentos de origen vegetal. Tinturas y Extractos fluidos. La Habana: MINSAP;1992.
 14. Crebelli R, Conti G, Conti L, Carere A. *In vitro* studies of nine known of suggested spindle poisons: results in tests of chromosome malsegregation in *Aspergillus nidulans*. Mutagenesis. 1991;6:131-6.
 15. Scott BR, Käfer E. *Aspergillus nidulans*: an organism for detecting a range of genetic damage. New York: Plenum Press;1982.p.447-78.
 16. Georgopoulos SG, Kappas A, Hastie AC. Induced sectoring in diploid *Aspergillus nidulans* as a criterion of fungitoxicity by interference with hereditary process. Phytopathol.1976;66:217.
 17. Kappas A. Genotoxicity of plant growth regulators in *Aspergillus nidulans*. Carcinogenesis. 1982;4:1409-10.
 18. De la Torre RA, de la Rúa R, Hernández G, Espinosa JJ, Cortinas de Nava C. Genotoxic effects of niclosamide in *Aspergillus nidulans*. Mutat Res. 1989;222:337-41.
 19. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. En: Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. New York: Plenum Press;1976.p.31-56.
 20. Finney DJ. Probit analysis. 3ra ed. Cambridge: Cambridge University Press;1971.p.20-49.
 21. Dunnett C, Goldsmith H. When and how to do multiple comparisons. En: Statistics in pharmaceutical industry. New York: Decker;198:397-433.
 22. Lovell DP, Albanese R, Clare G, Richold M, Savage JRK, Anderson D, et al. Statistical analysis of *in vivo* cytogenetic assays. En: Statistical evaluation of mutagenesis test data. Cambridge: Cambridge University Press;1989:185-231.
 23. Robbins SI, Cotran RS. Patología estructural y funcional. 3ra ed. La Habana: Edición Revolucionaria;1988.p. 904,1010-9(Parte II).

Recibido: 3 de febrero de 2006. Aprobado: 12 de mayo de 2006.

Dra. *Neylim Blanco Hernández*. ISCMH: Facultad de Medicina “Salvador Allende”. La Habana, Cuba.

¹Especialista I Grado de Farmacología.

²Licenciado en Biología.

³Licenciado en Biología. Investigador Auxiliar.