

## Toxicología subcrónica del extracto acuoso de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng

### Subchronic toxicology of the aqueous extract of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng

Dra. Juana Tillán Capó<sup>I</sup>; Dra. Viviana Bueno Pavón<sup>II</sup>; Lic. Rosa Menéndez Castillo<sup>III</sup>, Téc. Carmen Carrillo Domínguez<sup>IV</sup>; Téc. Melba Ortiz Infante<sup>V</sup>

<sup>I</sup> Doctora en Ciencias Veterinarias. Licenciada en Bioquímica Farmacéutica. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ciudad de La Habana, Cuba.

<sup>II</sup> Médico Veterinaria. Especialista en Anatomía Patológica. CIDEM.

<sup>III</sup> Licenciada en Bioquímica Farmacéutica. Investigadora Auxiliar. CIDEM.

<sup>IV</sup> Técnica en Farmacia. CIDEM.

<sup>V</sup> Técnica en Anatomía Patológica. CIDEM.

---

#### RESUMEN

**OBJETIVOS:** por el amplio uso de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (orégano francés) en la población y por su posible utilización a largo plazo en las afecciones convulsivas y el tracto respiratorio, se planteó el estudio toxicológico subcrónico de un extracto acuoso (liofilizado) de las partes aéreas.

**MÉTODOS:** se llevó a cabo en ratas Wistar de los 2 sexos, administrados por vía oral a las dosis de 500 y 50 mg de sólidos totales liofilizados/kg de peso corporal durante 90 d; los animales fueron pesados semanalmente y al final del tratamiento se muestrearon para la determinación de los indicadores hematológicos y químicos sanguíneos, así como el estudio histológico de órganos.

**RESULTADOS:** el comportamiento de los animales y los indicadores evaluados no fueron afectados por el tratamiento, las alteraciones microscópicas observadas en los animales fueron esporádicas con muy baja incidencia en todos los grupos.

**CONCLUSIONES:** el estudio no demostró efectos tóxicos en los animales, que pudieran estar asociados a la administración repetida del extracto acuoso liofilizado de *Plectranthus amboinicus*.

**Palabras clave:** Ratas Wistar, *Plectranthus amboinicus*, toxicidad subcrónica, orégano francés, extracto acuoso.

---

## ABSTRACT

**OBJECTIVES:** Due to the wide use of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (French oregano) in the population and to its possible use on the long term in the convulsive affections and the respiratory tract, it was recommended the toxicological subchronic study of an aqueous extract (freeze-dried) of the aerial parts.

**METHODS:** the study was conducted in Wistar rats of both sexes. Doses of 500 and 50 mg of freeze-dried total solids/kg of body weight were administered by oral route during 90 days. The animals were weekly weighted and at the end of the treatment they were sampled to determine the haematological and blood chemical indicators, as well as the histological study of organs.

**RESULTS:** the behavior of the animals and the evaluated indicators were not affected by the treatment. The microscopic alterations observed in the animals were sporadic with a very low incidence in all groups.

**CONCLUSIONS:** the study did not prove the existence of toxic effects in the animals that could be associated with the repeated administration of the freeze-dried aqueous extract of *Plectranthus amboinicus*.

**Key words:** Wistar rats, *Plectranthus amboinicus*, subchronic toxicity, French oregano, aqueous extract.

---

## INTRODUCCIÓN

El orégano es una planta perteneciente a la familia Lamiaceae. En Cuba, se reporta la especie *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., conocida popularmente como orégano francés, muy utilizado como condimento y en remedios caseros.<sup>1</sup>

Se reconocen sus efectos tanto farmacológicos como bacteriostáticos, expectorante, hipotensor, diurético, espasmolítico, antitusivo, antiasmático. Es utilizado también en la epilepsia y otras afecciones convulsivas, estas han sido corroboradas por el Centro de Bioactivos Marinos (CEBIMAR).<sup>2,3</sup>

Los estudios toxicológicos subcrónicos de las sustancias permiten evaluar el potencial toxicológico y obtener información sobre la toxicidad acumulativa de una sustancia en los órganos diana, así como la tolerancia fisiológica y metabólica de un compuesto a la exposición prolongada a bajas dosis.<sup>4</sup> Para estos estudios existen

regulaciones establecidas para el diseño, la conducción del ensayo y la interpretación de los resultados.<sup>4-7</sup>

Por causa del amplio uso de la planta en la población y por su posible utilización a largo plazo en las afecciones convulsivas y del tracto respiratorio se planteó el estudio toxicológico subcrónico del extracto acuoso (liofilizado) de *P. amboinicus*.

## MÉTODOS

Animales: se seleccionaron 48 ratas Wistar saludables, 24 hembras y 24 machos, procedentes de la colonia del Laboratorio de Investigaciones Biológicas, con pesos corporales de  $130 \pm 10$  g. Se distribuyeron a razón de 8 animales por jaulas con cambios de lechos 3 veces por semana. La temperatura de la sala de prueba fue de  $23 \pm 2$  °C, humedad relativa de 65 % y la iluminación en ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h.

La alimentación consistió en pienso CMO 1 000 suministrada por el Centro Nacional de Producción de Animales para Laboratorios (CENPALAB) y agua acidulada a voluntad.

La sustancia a evaluar fue el extracto acuoso liofilizado de *P. amboinicus* procedente del Laboratorio Farmacéutico "Mario Muñoz".

Las partes aéreas del material vegetal fueron colectadas en la Estación Experimental de Plantas Medicinales "Dr. Juan Tomás Roig", se seleccionaron las hojas para el secado artificial a 40 °C y molinado; posteriormente se sometió a extracción con agua purificada en la relación 1:5 y ebullición. El extracto filtrado se concentró y sometió al proceso de secado por liofilización hasta obtener un polvo seco, el cual se conservó e identificó en frasco de vidrio para el ensayo con número de lote EAL-001.

Una muestra de partes aéreas de *P. amboinicus* se identificó y depositó en el propio herbario de la Estación con el voucher ROIG 4579.

Los tratamientos consistieron en la administración, por vía oral, del extracto acuoso de orégano liofilizado a la dosis de 50 mg/kg y 500 mg de sólidos totales liofilizados/kg de peso corporal, equivalentes a 0,5 y 5 g de droga seca/kg. El liofilizado fue preparado en agua a las concentraciones de 2 y 20 %, respectivamente. Se utilizó un grupo control con agua.

En todos los tratamientos, el volumen administrado correspondió a 2,5 mL/kg de peso corporal. Los animales fueron pesados semanalmente e identificados individualmente; se realizó el ajuste de la dosificación de acuerdo con el peso por semana.

El tiempo de tratamiento fue de 12 semanas, terminado este período se procedió a la extracción de sangre a todos los animales para realizar el examen hematológico y la química sanguínea.

Para el examen hematológico, se efectuaron las determinaciones de hematócrito, hemoglobina y conteo diferencial.<sup>8</sup>

Los exámenes de química sanguínea se realizaron en el suero obtenido por centrifugación de la sangre a 3 000 rpm durante 10 min. Para ello se utilizó kit comercial de Boehringer Manhein (Alemania) y las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro Pye Unicam Phillips PV 8610.

Al finalizar el período de tratamiento y muestreo se realizó la eutanasia de los animales con el empleo de una cámara saturada de éter etílico para narcosis, posteriormente se procedió a la extracción y el pesaje de órganos, a la observación macroscópica e inclusión en solución de formol 10 %. Los órganos una vez fijados en formalina fueron incluidos en parafina para la realización de los cortes histológicos y tinción con hematoxilina y eosina.

El presente trabajo se hizo de acuerdo con las regulaciones internacionales establecidas para los ensayos de toxicidad subcrónica,<sup>4-7</sup> y las Normas Éticas fijadas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS, siglas en inglés) para el manejo de animales en la experimentación.<sup>9,10</sup>

Toda la información se procesó en una microcomputadora mediante el programa de Microsta, con el cual se obtuvieron las medias y los errores estándar por sexo y por grupo. También se realizó el análisis de varianza para los indicadores estudiados y la prueba de *Duncan* para las diferencias entre medias.<sup>10</sup>

## RESULTADOS

Incidencia de muertes durante el ensayo: en el grupo de animales machos correspondiente a la dosis menor hubo un solo caso de muerte (306) a la sexta semana de tratamiento. La observación macroscópica de los órganos no mostró alteraciones aparentes que pudieran relacionarse con la muerte.

Cambios en el peso corporal: en las figuras [1](#) y [2](#) se muestran las curvas de comportamiento de peso corporal para los 2 sexos, por grupo o dosificación, durante el período de tratamiento.

En la [tabla 1](#) se presentan los valores medios de hemoglobina en g/dL para los diferentes grupos de los 2 sexos, como se observa no se encontró diferencia significativa entre tratamiento y tampoco entre sexos. Los valores medios de hematócrito en porcentaje de los grupos tratados no difieren del control, tampoco se encontró diferencia entre sexos. La composición media de leucocitos del conteo diferencial se comportó según se observa en la tabla 1. En todos los animales los linfocitos son los más abundantes en relación con el resto de los leucocitos.

Química sanguínea: los valores medios de glucosa, proteína, alanino-amino-transferasa, aspartato-amino-transferasa y urea (tabla 1). El análisis estadístico realizado para cada uno de estos indicadores dentro de cada sexo, no mostró diferencia significativa entre los valores correspondientes a los animales del grupo control y los animales tratados con *P. amboinicus*, por lo que se puede plantear que no se encontraron alteraciones en los indicadores sanguíneos estudiados que pudieran estar asociados a la sustancia administrada.

En la [tabla 2](#) se muestran los valores medios del peso relativo de los órganos siguientes: corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón, ovarios y testículos. En el análisis de varianza no se encontraron diferencias significativas en los valores medios de los

pesos relativos de órganos entre los grupos tratados y el grupo control para cada sexo.

No se presentaron alteraciones aparentes en los órganos observados macroscópicamente.

En las observaciones microscópicas de los órganos se encontró:

Corazón: solo un animal del grupo de la dosis mayor de hembras presentó algunos focos hemorrágicos en el miocardio (508). El resto de los animales no presentaron alteraciones tanto para el grupo control como para los grupos tratados.

Pulmón: en todos los grupos (tratados y control) se observaron alteraciones del parénquima pulmonar con igual incidencia (alrededor de 30 %). Las alteraciones pulmonares no deben considerarse como una consecuencia de la sustancia administrada porque la frecuencia de aparición es muy similar.

Hígado, estómago e intestinos: se observaron escasas congestiones leves del hígado en algunos animales tratados y controles, lo cual está relacionado muchas veces con el tipo de sacrificio.

El estómago, intestino delgado y grueso: no presentaron alteraciones en ningún animal de los diferentes grupos.

Riñón: en los grupos controles se observó un caso con congestión córtico-medular y solo 1 animal del grupo de los machos (105) presentó extensas zonas de nefritis intersticial.

El grupo de animales machos que recibieron la dosis menor de orégano (50 mg/kg de peso corporal) presentó un caso con foco de nefritis intersticial. También en el grupo de las hembras de la dosis mayor se presentó un caso con ligeros focos de nefritis intersticial (503).

#### *Sistema nervioso central*

Cerebro: en el grupo control macho, se observó incremento de células inflamatorias solamente en un animal.

#### *Órganos sexuales*

Testículos: se encontró un animal (303), dosis menor, y 1 animal (204), dosis mayor, con edema intersticial, el resto de los animales no presentaron alteraciones en este órgano.

Ovario: no se presentó ningún tipo de alteraciones del tejido de este órgano en los animales con los diferentes tratamientos.

## **DISCUSIÓN**

No se presentó mortalidad por la administración acumulativa del orégano durante el período experimental porque solo un animal de la dosis de 50 mg/kg de peso corporal murió a la sexta semana de tratamiento, lo cual no se puede atribuir al

tratamiento, por causa de la baja incidencia y la ausencia de manifestaciones tóxicas; por otra parte, en la observación macroscópica no se apreció alteraciones en los órganos y tejidos analizados del animal.

Durante el período de administración los animales no presentaron síntomas tóxicos que pudieran estar relacionados con las sustancias o los metabolitos del extracto, esto pudiera atribuirse a una baja toxicidad y/o a la baja acumulación en los órganos y tejidos reportados en los estudios de toxicidad aguda realizado al extracto acuoso liofilizado del *P. amboinicus*, donde la LD50 en ratones mostró valores en el rango de 7 300 a 9 300 mg/kg de peso corporal (*K. Rodríguez* y otros, Informe de Toxicidad aguda, 1994) considerando al extracto como no tóxico, o en la terminología más moderna como no clasificado.<sup>11,12</sup>

Las curvas de incremento de peso corporal en el tiempo, de los animales tratados y control para cada sexo, mostraron comportamientos muy similares, por lo que se puede plantear que este indicador no se afectó por la administración del extracto durante las 12 semanas, con los dos niveles de dosis.

Los indicadores hematológicos y bioquímicos determinados en el presente estudio se presentan dentro de los rangos normales reportados para ratas Wistar<sup>13-15</sup> y los determinados en el Laboratorio de Investigaciones Biológicas para esta colonia.<sup>16</sup>

Los altos porcentajes de linfocitos dentro del conteo diferencial de leucocitos es una característica de la especie, reportada por *Iffa Credo*<sup>15</sup> y por estudios anteriores realizados a la colonia,<sup>16</sup> que se consideraron dentro de los rangos normales de la especie.

Los valores de peso relativos de los órganos estudiados no mostraron diferencia significativa entre los grupos analizados dentro de cada sexo, por lo cual no se pueden plantear alteraciones de peso de ningún órgano como índice de efectos tóxicos, y se pudiera asumir una vez más la ausencia de acumulación de algún componente del extracto, esto en parte alcanzaría esperarse porque las sustancias extraíbles son todas solubles en agua de fácil eliminación por el organismo.

Las afectaciones encontradas en órganos y tejidos mediante los estudios histológicos tuvieron una incidencia muy baja (1 animal) en los grupos que presentaron alguna alteración, incluido el grupo control que también tuvo las mismas incidencias en algunos de los casos.

La nefritis intersticial se presentó con igual incidencia, un animal por grupo en todos los casos, que resultó muy baja, por lo cual estos hallazgos no permiten establecer a este órgano como diana, pero sí pudiera ser objeto de observación en administraciones posteriores y a dosis superiores.

El órgano más afectado ha sido el pulmón que se comportó de forma similar en todos los grupos, este indicador es uno de lo más afectados en estudios a largo plazo. Por la incidencia presentada en animales de todos los grupos, incluidos los animales controles, no se puede asociar a una toxicidad debida a la administración de la sustancia de ensayo.<sup>4,16</sup>

Algunas de las afectaciones observadas han sido catalogadas como esporádicas por causa de la baja incidencia de aparición en todos los grupos o consideradas como trastornos propios del proceso de eutanasia, como los casos de congestión que se reportan en algunos de los órganos estudiados.

Se puede plantear que el estudio de toxicidad subcrónica realizado en estas condiciones experimentales al extracto acuoso liofilizado de *P. amboinicus* no demostró efectos tóxicos que pudieran asociarse a su administración, porque el comportamiento de los animales y los indicadores evaluados no resultaron afectados, y las alteraciones microscópicas observadas fueron esporádicas con muy baja incidencia en casi todos los tratamientos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roig JT. Plantas Medicinales Aromáticas o Venenosas de Cuba. 2ª ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1967. p. 597-8.
2. Bu Wong M, Sánchez Rodríguez MN, Fernández Pérez MD, Díaz Gutiérrez N, Buznego Rodríguez MT, Pérez-Saad H. Establecimiento del kindling por lidocaína en el mono verde. Estudio preliminar de la acción del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (orégano francés). Rev Cubana Plant Med. 1997;2(2-3):45-7.
3. Buznego Rodríguez MT, Fernández Pérez MD, Llanio Villate M, León Alonso N, Acevedo González ME, PérezSaad H. Perfil neurofarmacológico de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. (Orégano francés. Potenciación de las estereotipias inducidas por anfetamina). Rev Cubana Plant Med. 1999;3(4):15-7.
4. Mosberg AT, Hayes AW. Subchronic toxicity testing. In: Principles and methods of toxicology. Wallace Hayes A, editors. 3<sup>th</sup> ed. New York: Raven Press Ltd.; 1994. p. 221-35.
5. Universities Federation for Animal Welfare. The Ufaw Handbook on the care and management of laboratory animals. 7ª ed. V.1. Terrestrial vertebrates. Part 3, Species kept in the laboratory. Blackwell Science Ltd; 1999. p. 162-74.
6. Guide for the care and use of laboratory animals. National Research Council. Washington: National Academy Press; 1996. p. 21-79.
7. OECD. Test guideline 408. Repeated dose 90-day. Oral toxicity study in rodents. In: OECD Guidelines for the testing of chemicals. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development; 1998. p. 1-10.
8. Circor Ruíz F, Farreras Valentín P. Diagnóstico hematológico. Tomo 1. Barcelona:Ed. Jims; 1972. p. 30-1.
9. Joseph KH, Walter BP. Statistical analysis of developmental toxicity data. Development toxicology. In: Principles and methods of toxicology. Wallace Hayes A, editor. 3<sup>th</sup> ed. New York: Raven Press; 1994. p. 349-61.
10. CIOMS: Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas. Principios Guías Internacionales para la Investigaciones Biomédicas que implique animales. Normas, documentos y ética médica. Ginebra; 1985, p. 97-107.
11. Schlede E, Mischke U, Roll R, Kayser D. A national validation study of the Acute-Toxic- Class Method An alternative to the LD<sub>50</sub> test. Arch Toxicol. 1992;66:455-70.

12. Schlede E, Genschow E, Spielmann H, Stropp G, Kayser D. Oral Acute Toxic Class Method: A successful alternative to the oral LD<sub>50</sub> test. Regul Toxicol Pharmacol. 2005;42(1):15-23.
13. Wolford ST, Schroer RA, Gohs FX, Gallo PP, Brodeck M, Falk HB. Reference range data base for serum chemistry and haematology values in laboratory animals. J Toxicol Environm Health. 1986;18:161-88.
14. Lewis PJ, Marsboon RP. Toxicology reference data Wistar rat research Lab. Janssen Pharmaceutica. Biomedical Press:New York; 1981:59-61.
15. Iffa Credo (Institut Francais De La Fie` Vre Aphteuse Centre De Recherche Et D` Elevage Du Domaine Des Oncins). France:Edico Publicis. Atl/Pronted, L´Arbresle; 1990. p. 45-6.
16. Tillán JI, Cabrera Y. Valores hemoquímicos normales de ratas Wistar del CENPALAB y del Laboratorio de Investigaciones Biológicas. Ciudad de La Habana, Cuba: 4ª Reunión Anual Científica Técnica sobre Animales de Laboratorios; 1994.

Recibido: 10 de septiembre de 2007.  
Aprobado: 17 de septiembre de 2007.

Dra. *Juana Tillán Capó*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave 26 No. 1605 entre/ Puentes Grandes y Ave. Boyeros, Plaza, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: [juanatc@infomed.sld.cu](mailto:juanatc@infomed.sld.cu)  
Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Ciudad de La Habana, Cuba.

Tabla 1. Valores medios de los indicadores hematológicos y bioquímicos

Sexo	Machos			Hembras		
Dosis mg/kg	0	500	50	0	500	50
Indicadores bioquímicos						
Glucosa mmol/L	5,50 ± 2,2	5,30 ± 0,9	6,17 ± 1,4	3,40 ± 1,6	3,02 ± 1,3	3,08 ± 0,9
Proteína g/dL	8,19 ± 1,3	8,77 ± 1,5	8,34 ± 1,0	8,02 ± 1,6	8,01 ± 1,7	7,81 ± 1,3
GTP (UI)	18,87 ± 4,9	19,14 ± 5,5	15,37 ± 4,6	10,14 ± 4,0	9,75 ± 3,3	6,14 ± 2,4
GOT (UI)	79,50 ± 9,4	76,50 ± 6,7	72,60 ± 8,3	71,50 ± 6,3	69,00 ± 7,9	65,00 ± 7,4
Urea mmol/L	1,51 ± 0,5	1,47 ± 0,4	1,75 ± 0,5	-	-	-
Indicadores hematológicos						
Hemoglobina g/dL	16,85 ± 1,2	16,81 ± 1,1	15,40 ± 0,9	16,24 ± 0,8	15,74 ± 0,8	16,45 ± 0,5
Hematócrito %	49,20 ± 2,7	49,00 ± 0,9	47,07 ± 2,7	49,62 ± 1,8	49,83 ± 0,5	51,90 ± 2,7
Neutrófilo %	20,20 ± 3,2	15,50 ± 4,2	20,10 ± 3,4	18,60 ± 5,3	17,00 ± 4,7	18,80 ± 3,2
Eosinófilo %	5,80 ± 1,2	4,75 ± 1,8	3,50 ± 0,9	3,50 ± 0,8	3,50 ± 1,0	4,80 ± 1,2
Linfocitos %	71,20 ± 4,5	77,50 ± 5,1	73,50 ± 3,8	78,80 ± 4,8	79,25 ± 5,2	74,20 ± 4,9
Monocitos %	2,80 ± 0,8	2,25 ± 0,5	2,00 ± 0,7	1,00 ± 0,4	0,75 ± 0,2	1,60 ± 0,4

Tabla 2. Porcentaje de peso relativo medios de los órganos

Sexo	Machos			Hembras		
Dosis mg/kg	0	500	50	0	500	50
Peso relativo de órganos (%)						
Corazón	0,318 ± 0,01	0,296 ± 0,03	0,304 ± 0,06	0,386 ± 0,04	0,310 ± 0,02	0,334 ± 0,05
Pulmón	0,412 ± 0,03	0,400 ± 0,07	0,410 ± 0,10	0,577 ± 0,14	0,484 ± 0,03	0,517 ± 0,16
Hígado	3,044 ± 0,24	3,318 ± 0,26	3,291 ± 0,24	3,475 ± 0,28	3,108 ± 0,22	3,351 ± 0,25
Bazo	0,158 ± 0,02	0,180 ± 0,02	0,196 ± 0,06	0,206 ± 0,05	0,164 ± 0,02	0,202 ± 0,08
Riñón	0,310 ± 0,02	0,313 ± 0,03	0,326 ± 0,05	0,369 ± 0,07	0,331 ± 0,05	0,343 ± 0,04
Cerebro	0,463 ± 0,06	0,467 ± 0,03	0,409 ± 0,07	0,584 ± 0,13	0,559 ± 0,06	0,573 ± 0,13
Ovario	-	-	-	0,035 ± 0,01	0,032 ± 0,01	0,031 ± 0,01
Testículos	0,703 ± 0,18	0,711 ± 0,14	0,683 ± 0,20	-	-	-