

## Toxicidad aguda y subaguda oral del extracto acuoso liofilizado de *Rhizophora mangle* L. en ratas

### Oral acute and sub-acute toxicity of dried aqueous extract from *Rhizophora mangle* L. in rats

Luz María Sánchez Perera<sup>I</sup>; Ivis Fraga Chávez<sup>II</sup>; Betty Macebo Dorveny<sup>III</sup>; Rafael Lorenzo Miranda<sup>IV</sup>

<sup>I</sup> Licenciada en Química. Doctora en Ciencias Veterinarias. Profesora Adjunta de la Universidad Agraria de La Habana. Investigadora Titular. Departamento de Química, Farmacología y Toxicología. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

<sup>II</sup> Licenciada en Farmacia. Maestra en Ciencias en Tecnología Farmacéutica. Investigadora Agregada. Departamento de Química, Farmacología y Toxicología. CENSA.

<sup>III</sup> Licenciada en Farmacia. Reserva Científica. Departamento de Química, Farmacología y Toxicología. CENSA.

<sup>IV</sup> Técnico Medio en Veterinaria. Departamento de Química, Farmacología y Toxicología. CENSA.

---

#### RESUMEN

**Fundamento:** *Rhizophora mangle* L. es una planta de gran distribución en Cuba, de la cual se ha demostrado científicamente efectos sobre las úlceras gastroduodenales mediante diversos mecanismos de acción: citoprotección, antisecretor, inhibe la disminución de prostaglandina PGE<sub>2</sub> y posee efectos cicatrizantes, sin embargo, no cuenta con estudios de toxicidad.

**Objetivos:** determinar la toxicidad aguda y subaguda oral del extracto acuoso seco de las cortezas de *R. mangle*.

**Métodos:** se realizó el estudio preclínico mediante la evaluación del efecto del extracto acuoso de *R. mangle* en modelos agudos a dosis única (2 000 mg/kg de masa corporal) y a dosis repetida diaria durante 14 d del extracto en la dosis terapéutica máxima de 500 mg/kg mc. Se emplearon ratas *Sprague Dawley* hembras y machos, divididas en grupo de 5 animales de cada sexo por cada grupo experimental. Se realizaron observaciones sistemáticas y el día 14 del experimento se procedió a la eutanasia de los animales.

**Resultados:** el peso corporal se mostró característico para la especie, no hubo alteraciones en el peso de los órganos y no se manifestaron signos anatomopatológicos que evidenciaran efectos tóxicos.

**Conclusiones:** la dosis tóxica del extracto acuoso seco de *R. mangle* es superior a 2 000 mg/kg en estudio de dosis única y no es tóxico a dosis repetida en la dosis máxima terapéutica en un período de 14 d, por lo que se garantiza un amplio margen de seguridad.

**Palabras clave:** *Rhizophora mangle*, toxicidad aguda oral, toxicidad subaguda oral.

---

## ABSTRACT

**Rationale:** *Rhizophora mangle* L. is a highly distributed plant in Cuba, whose effects on gastrointestinal ulcers by several mechanisms of action like cytoprotection, anti-secretion, prostaglandin PGE<sub>2</sub> depletion inhibition and wound healing have been scientifically proved. However, no toxicity studies have been so far conducted

**Objectives:** To determinate oral acute and sub-acute toxicity of dried aqueous extract from *R. mangle* bark.

**Methods:** The preclinical study of the dried aqueous extract from *R. mangle* was performed in acute models at a single dose (2000 mg/Kg of body mass) and at daily repeated dose for 14 days at maximum therapeutic dose of 500 mg/Kg of body mass. Male and female *Sprague Dawley* rats divided into 5-rat groups of each sex per each experimental group. They were systematically observed until 14<sup>th</sup> day after the experiment when they were put away.

**Results:** Their body weigh was the characteristic one corresponding to the species. There was no change in the organ weight and no anatomopathological signs with toxic effects were found.

**Conclusions:** Toxic dose of the dried aqueous extract from *R. mangle* is over 2000 mg/Kg according to a study on single dose. It is not toxic either at repeated doses of maximum therapeutic effect for 14 days; therefore, a wide range of safety is warranted.

**Key words:** *Rhizophora mangle*, oral acute toxicity, oral subacute toxicity.

---

## INTRODUCCIÓN

*Rhizophora mangle* L. es un árbol de una alta distribución geográfica en el archipiélago cubano.<sup>1</sup> En estudios previos se demostró la actividad del extracto seco de las cortezas de esta planta en el tratamiento de úlceras gastroduodenales.<sup>2-4</sup>

Sánchez y otros,<sup>5</sup> demuestran la presencia en el extracto de un alto porcentaje de estructuras polifenólicas o taninos.

Los taninos están representados en la naturaleza mediante mezclas muy complejas, a las cuales se atribuyen no solo efectos farmacológicos como potentes antioxidantes, antivirales, anticancerígenos y sobre enfermedades

cardiovasculares.<sup>6</sup> Sin embargo, también se describe en la literatura la capacidad de estos compuestos de poseer algunos efectos tóxicos y fundamentalmente como antinutricionales por provocar la excreción de alto contenido de proteínas dietéticas y endógenas.<sup>7,8</sup> Por esta razón, se hace necesario una vez comprobados los efectos farmacológicos de esta planta sobre el tratamiento de las úlceras gastroduodenales, verificar su seguridad en la administración a humanos.

El objetivo del presente trabajo consistió en la evaluación preclínica de la toxicidad a dosis única y dosis repetida por vía oral en un estudio de 14 d.

## MÉTODOS

El estudio se realizó en el Área de Experimentación Animal del Departamento de Química, Farmacología y Toxicología del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

Se emplearon ratas *Sprague Dawley* de los 2 sexos, suministradas por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), con peso corporal comprendidos entre 180 y 200 g. Los animales se mantuvieron en adaptación durante una semana previa al experimento y sometidos a alimentación convencional y agua *ad limitum*, así como un ciclo de luz/oscuridad de 12/12, temperatura ambiente de 25 °C y humedad controlada de 50 a 70 %.

Al comienzo de los experimentos los animales se colocaron en cajas individualmente y se emplearon 10 animales en cada grupo experimental (5 hembras y 5 machos).

En el estudio de la toxicidad oral aguda se utilizó una dosis única límite de 2 000 mg/kg de masa corporal del extracto acuoso liofilizado de las cortezas de *R. mangle*, así como un grupo control negativo al cual se le administró agua destilada.

En el estudio de toxicidad oral subaguda se administró mediante intubación intragástrica la dosis de 500 mg/kg de masa corporal del extracto liofilizado de *R. mangle* durante los 14 d de la experimentación. En este experimento se empleó también un grupo control negativo que recibió agua por igual vía de administración.

El extracto acuoso de *R. mangle* se preparó con cortezas colectadas en Camagüey en 2007, una muestra de la planta se guardó en el herbario del Jardín Botánico Nacional (HAJB 6538). Las cortezas se molinaron hasta tamaño de partícula de 40 mesh, se sometieron a una decocción en reactores de 2 L, de laboratorio en una proporción 1: 7, durante 30 min, posterior de los cuales se sometió a filtración y centrifugación. El extracto final obtenido se liofilizó y se conservaron en nailon de polietileno sellados.

En ambos experimentos se sometieron a inspección clínica diaria y a la realización de pesaje los días 1, 7 y 14. El día 14 los animales fueron sometidos a eutanasia, se pesaron los órganos hígado, riñones y corazón. Se procedió a la evaluación anatomopatológica, con el estudio macroscópico de los órganos hígado, corazón y riñones y se procedió al estudio histopatológico. Todas las muestras fueron procesadas por la técnica clásica de inclusión y cortes en bloques de parafina, previa fijación en formol neutro 10 %, se colorearon con hematoxilina y eosina.

Análisis estadístico: se aplicó el sistema estadístico SAS, se valoró la distribución normal de los parámetros peso relativo de los órganos hígado, corazón y riñones, así como para la ganancia de peso. Se aplicó ANOVA multifactorial y comparación de media por la prueba de rango múltiple de *Duncan*.

## RESULTADOS

### Toxicidad aguda

De manera general, tras la administración de una dosis única del extracto acuoso liofilizado de *R. mangle* en una dosis límite de 2 000 mg/kg de masa corporal, no se observaron signos clínicos, solo una rata del sexo macho en el grupo tratado mostró erizamiento y tristeza en las primeras horas tras la administración en el día 1. Posteriormente, no se evidenció ninguna anormalidad ni en el grupo control, ni en el grupo tratado, durante los 14 d del experimento.

No se observaron cambios macroscópicos que evidenciaran signos de toxicidad, sin embargo se procedió al muestreo de los órganos fundamentales: hígado, riñones y corazón para su estudio microscópico. De manera general no se evidenciaron cambios microscópicos en estos órganos, se observó esteatosis focal solo en el caso de una hembra dentro del grupo tratado, es decir, un punto de acumulación de grasa en el hígado. Este hallazgo no es representativo dentro del grupo y al observar el peso relativo del hígado no presentaba aumento de peso, ni diferencia de peso con el resto de los animales en este grupo ni respecto a los controles. Se observó degeneración hidrópica en 1 hembra y 2 machos del grupo tratado, así como en 2 machos del grupo control, lo que puede estar asociado con la dieta. Por lo que de manera general apunta a no hallazgos microscópicos que evidencien toxicidad ([tabla](#)).

En cuanto a ganancia de peso en los días 7 y 14, se observó una ligera disminución del peso en las ratas machos, sin embargo esta disminución no fue significativa al compararla con el grupo control, igual sexo. El comportamiento de ganancia en las hembras a los 7 d, se manifestó una disminución de peso en las controles, por lo que esto verifica que no es atribuible tratamiento ([fig. 1](#)).

Al comparar el peso corporal de los animales en los días 1, 7 y 14 se verifica lo planteado anteriormente, se demostró un comportamiento en el incremento del peso normal y no existieron diferencias entre controles y tratados ([fig. 2](#)).

Al analizar el peso relativo de los órganos hígado, corazón y riñones no se evidenció diferencias significativas entre los grupos controles y tratados, tanto considerando tratamiento como sexo ([fig. 3](#)). Por lo tanto queda demostrado que el extracto acuoso de *R. mangle* no muestra signos tóxicos en un nivel de dosis límite de 2 000 mg/kg de masa corporal.

### Toxicidad subaguda

En el ensayo de toxicidad subaguda del extracto acuoso liofilizado de *R. mangle*, en un estudio de 14 d con administración de dosis repetida en un nivel de dosis de 500 mg/kg de masa corporal, máxima dosis terapéutica (14 administraciones), se observaron los resultados siguientes:

No se evidenció de manera general signos clínicos relevantes en el desarrollo del experimento, solo una rata macho de las tratadas mostró ligera tristeza después de la administración número 7; este mismo animal mostró disnea, erizamiento del pelo y mucosa morada pálida en la administración número 10, después de lo cual no evidenció ningún otro signo, sobrevivió al tratamiento y a las nuevas administraciones hasta el día del sacrificio.

En cuanto a ganancia de peso, a los 7 d se mostró una ganancia de peso buena en los 2 sexos en el grupo tratado, en el caso de las hembras resultó superior que en el grupo control. Sin embargo, no posee relevancia desde el punto de vista estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo control. En el día 14 los machos mostraron buena ganancia de peso con excepción de un animal que no tuvo ganancia, pero tampoco pérdida de peso. En el caso de las hembras del grupo tratado, 2 animales presentaron pérdida de peso. Sin embargo, si se analizan los resultados que se muestran en la [figura 4](#), se puede observar que no existieron diferencias significativas con respecto al grupo control, por lo cual este parámetro de peso no presenta efectos tóxicos en el estudio a dosis repetida del extracto acuoso de mangle (500 mg/kg de masa corporal) durante 14 d.

En la [figura 5](#) se verifica esta afirmación, de no afectar el peso corporal, comprobado por la no existencia de diferencias significativas entre grupos controles y grupos tratados.

En la [figura 6](#) se puede observar que no existió diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en cuanto a los pesos relativos de hígado, corazón y riñones, ni por tratamiento ni considerando tratamiento por sexo, respecto al grupo control.

En el estudio anatomopatológico no se evidenciaron efectos macroscópicos ni microscópicos atribuibles al tratamiento. Se observó en el estudio microscópico, ligera congestión hepática en el grupo tratado y en el grupo control, por lo que puede estar asociado con la dieta. En el caso del hígado se encontró en 2 hembras y en 1 macho del grupo tratado esteatosis focal, en estos casos se comparó de nuevo con el peso relativo de este órgano y de igual manera que en el estudio de toxicidad aguda, no se evidenció ninguna modificación del peso respecto al grupo control, ni respecto al resto de los animales en el grupo tratado. Por lo que de manera general no se evidencian hallazgos macroscópicos ni microscópicos que apunten a un efecto tóxico y se recomienda seguir la valoración estricta de este órgano en estudios posteriores de toxicidad subcrónica ([tabla](#)).

## DISCUSIÓN

En el campo de la nutrición animal al nivel mundial, los taninos condensados han sido el grupo de compuestos mejor estudiados en cuanto a su repercusión fisiológica y su amplia distribución;<sup>9</sup> otros metabolitos inhiben la digestión, al afectar la actividad catalítica de algunas enzimas,<sup>10</sup> y pueden restringir la absorción de los alimentos.<sup>11</sup>

Algunos metabolitos secundarios se han denominado factores antinutricionales (FANs), los que pueden causar un efecto negativo en el valor nutricional del alimento, así como en la salud animal y humana.

Los resultados en cuanto a la no presentación de efectos tóxicos en los estudios realizados en el presente trabajo, donde los taninos representan 56 % del extracto seco, coinciden con los reportes de estudios de toxicidad realizados con polvo de taninos obtenidos a partir de *Pinus caribaea* Morelet, quienes no encontraron efectos tóxicos de estos elementos en estudios de toxicidad aguda oral, dérmica.<sup>12</sup>

Por otro lado, se reporta también el efecto no tóxico por vía oral de tabletas de anamú (*Petiveria alliacea* L.) inmunoestimulantes, las que poseen como compuestos principales taninos.<sup>13</sup>

Otro ejemplo de especie vegetal con amplio contenido de taninos es el guaraná (*Paullinia cupana*), que no presenta efectos tóxicos en niveles de dosis de 1 000 y 2 000 mg/kg de masa corporal.<sup>14</sup>

Los taninos son compuestos polifenólicos que desempeñan acciones defensivas en las plantas frente a los insectos. En general tienen acción astringente, antimicrobiana, antifúngica, inhibitoria enzimática, curtir la piel y como antídoto de alcaloides y metales pesados. Se plantea que su toxicidad es baja en principio, pero pueden ocasionar intolerancias gástricas y estreñimiento. Los taninos hidrolizables son los que mayor toxicidad encierran. Su mecanismo de acción puede estar relacionado con su capacidad para inactivar adhesinas microbianas, enzimas, proteínas transportadoras en la célula, formar complejos con la pared celular, etc. También pueden ligar las proteínas de la piel y de la mucosa, las cuales transforman en sustancias insolubles.<sup>15</sup> Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten plantear que los polifenoles presentes en las cortezas de *R. mangle* no son tóxicos por vía oral y el valor de DL<sub>50</sub> del extracto acuoso seco de las cortezas de la planta está por encima de 2 000 mg/kg de masa corporal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Suman D. Situación de los manglares en América Latina y la Cuenca del Caribe. En Suman D, editor. El ecosistema de manglar en América Latina y en la Cuenca del Caribe: su manejo y conservación. Universidad de Miami & the Tinker Foundation: Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Science; 1994. p. 1-10.
2. Sánchez LM, Ruedas D, Gómez BC. Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L. J Ethnopharmacol. 2001;77:1-3.
3. Sánchez LM, Batista NY, Rodríguez A, Farrada F, Bulnes C. Gastric and Duodenal Antiulcer Effects of *Rhizophora mangle* L. Pharm Biol. 2004;42(3):225-9.
4. Berenguer B, Sánchez LM, Quilez A, López-Barreiro M, de Haro O, Galvez J, Martin MJ. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. J Ethnopharmacol. 2006;103(2):194-200.
5. Sánchez LM, Varcacel L, Escobar A, Noa M. Polyphenol and phytosterols Composition in an antibacterial extract from *Rhizophora mangle* L. 's bark. J Herbal Pharmacother. 2006;6(5).
6. Gee JM, Jonson IT. Polyphenolic compounds: Interaction with the gut and Implications for Human Health. Current Med Chem. 2001;8:1245-55.

7. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:19-34.
8. Scalbert A, Daprez S, Mila I, Albrecht AM, Huneau JF, Rabot S. Proanthocyanidins and human health: Systematic effects and local effects in the gut. Mini-review. *Biofactors.* 2000;13:115-20.
9. Ben Salem H, Nefzaoui A, Ben Salem L, Tisserand JL. Intake digestibility, urinary excretion of purine derivatives and growth by sheep given fresh, air-dried or polyethylene glycol-treated of foliage of *Acacia cyanophylla* Lindl. *Animal Feed Sc Technol.* 1999;98:297.
10. Delgado EJ. Factores antinutricionales. Curso de Fisiología digestiva. La Habana, Cuba: ICA; 1998. p. 2.
11. Liener IE. Plant lectins. Properties, nutritional significance and function. In: *Antinutrients and phytochemicals in food.* USA: American Chemical Society; 1997. p. 31.
12. Vega R, Lagarto A, García A, Pilot J, Santana JL, Gabilondo T. Toxicidad de un extracto tánico de *Pinus caribaea* Morelet. *Rev Cubana Plant Med.* 2005;2(2).
13. Lemus Z, García ME, Batista A, de la Guardia O, Alfonso A. La tableta de anamú: un medicamento herbario inmunoestimulante. *MEDISAN.* 2004;8(3):57-64.
14. Kuskoski EM, Roseane F, Garcia Agustín, Troncoso AM. Propiedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*Paullinia cupana*). *VITAE. Rev. Fac Quím Farm.* 2005;12(2):45-52.
15. Martínez AM. Flavonoides. Artículo de Tesina. Universidad de Antioquia, Colombia: Facultad de Química Farmacéutica; 2005.

Recibido: 25 de junio de 2008.

Aprobado: 5 de agosto de 2008.

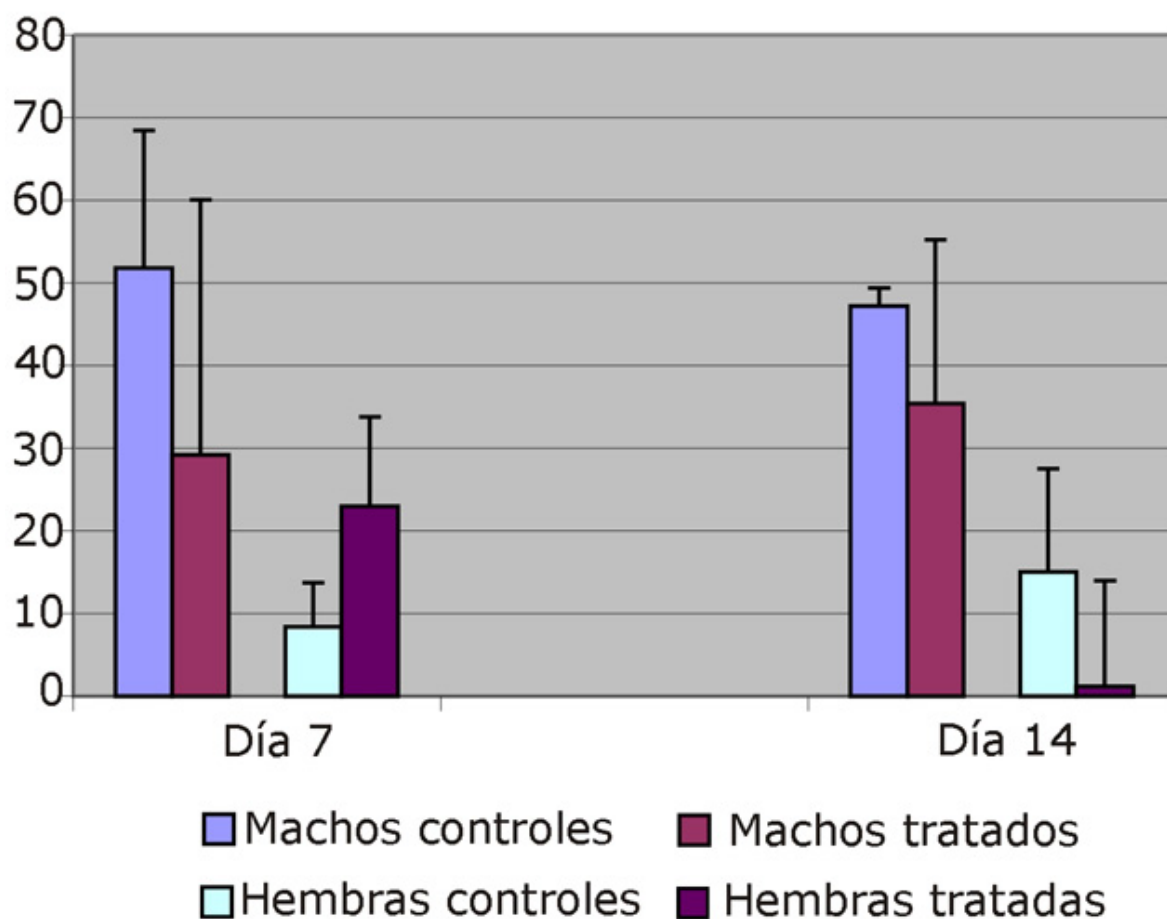
Lic. *Luz María Sánchez*. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA, Apdo. 10, CP 32 700, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Teléf.: 047- 863014. Ext. 26. Correo electrónico: [luzmaria@censa.edu.cu](mailto:luzmaria@censa.edu.cu)

Tabla. Resumen de cambios microscópicos en relación con los órganos y el sexo

Órganos	Lesión	Grupos					
		I (10)		II (10)		III (10)	
		H	M	H	M	H	M
Hígado	Esteatosis focal	-	-	1	-	2	1
	Degeneración turbia	-	-	2	-	-	1
	Degeneración hidrópica	-	2	1	2	-	1
	Congestión moderada	-	1	-	-	-	1
Riñón	Nefrocalcinosis	-	-	1	-	1	-
	Congestión capilar moderada	-	1	-	-	-	-
Corazón	Congestión capilar moderada	-	1	-	-	-	-

Grupo I: control negativo; Grupo II: grupo de toxicidad aguda, Grupo III: grupo de toxicidad subaguda, H: hembras, M: machos.

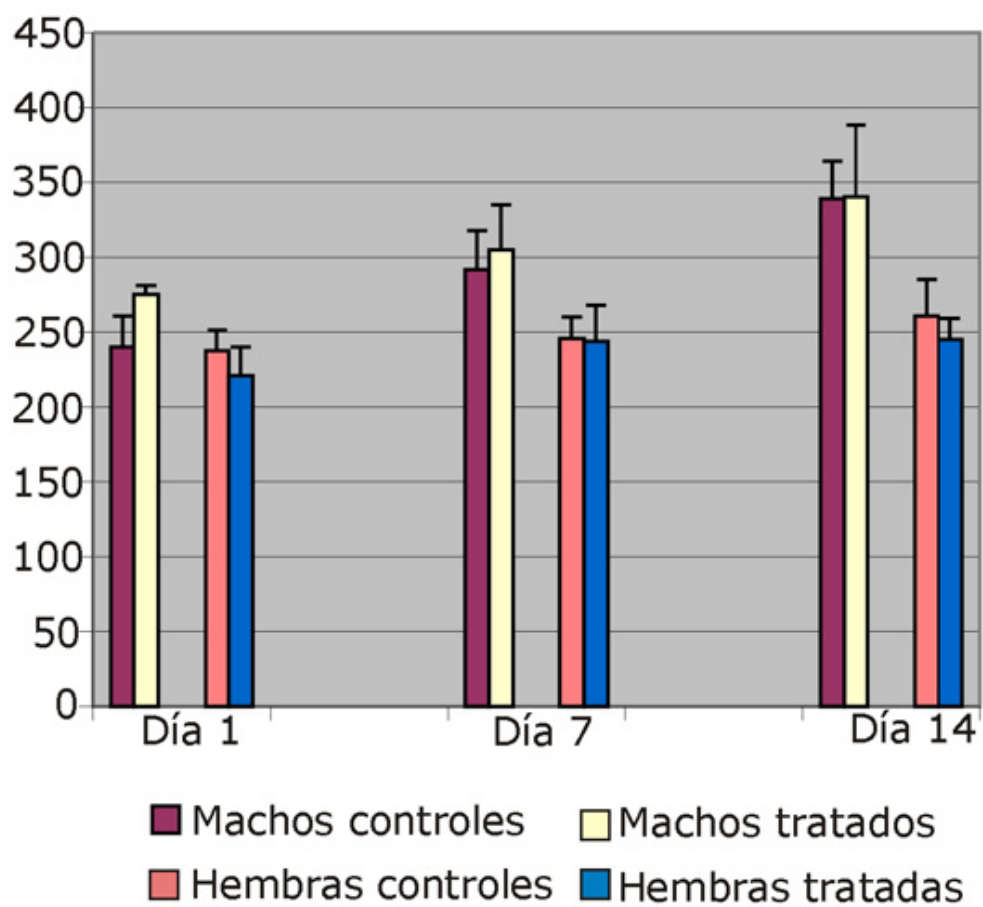
## Ganancia de peso



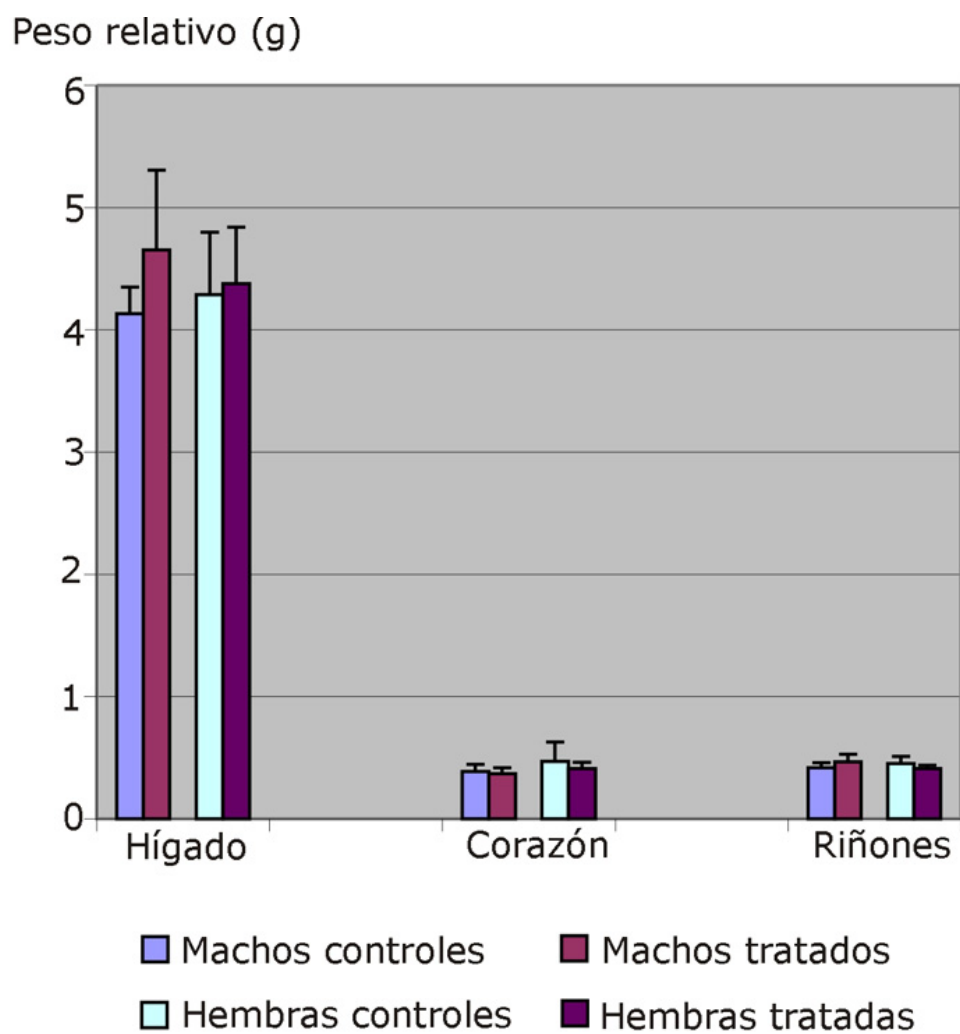
**Fig. 1.** Ganancia de peso en estudio de toxicidad aguda.



## Peso corporal

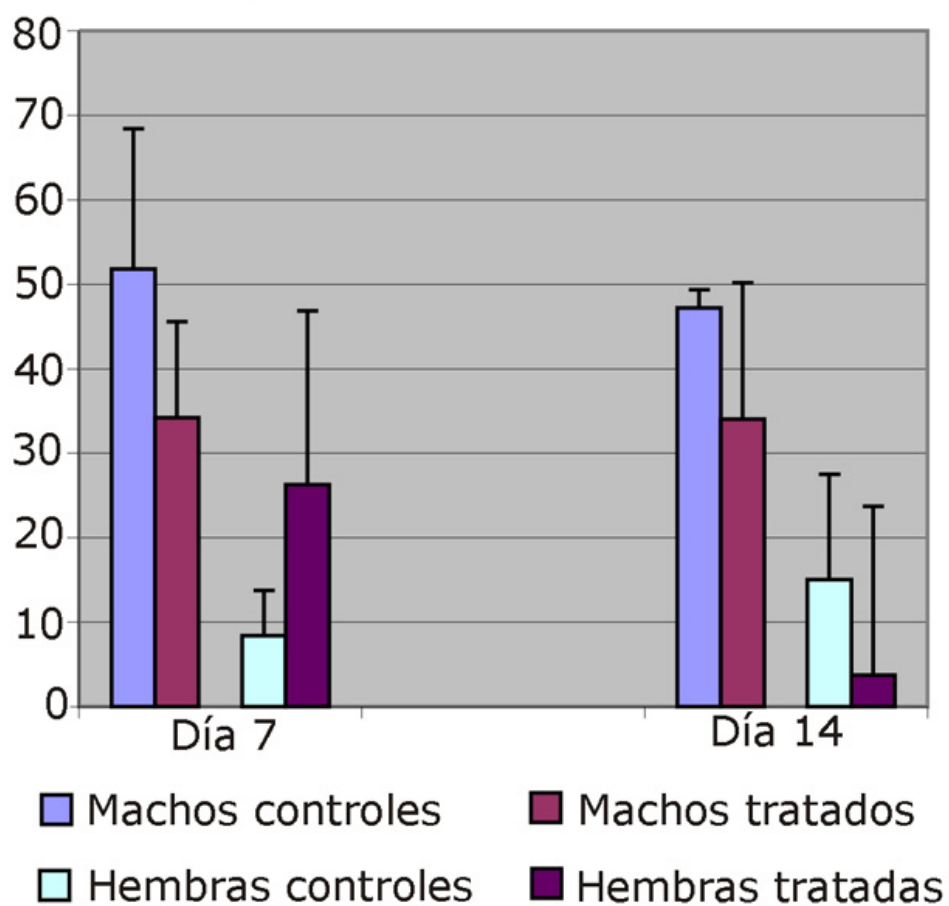


**Fig. 2.** Comportamiento del peso corporal en la evaluación de toxicidad aguda.

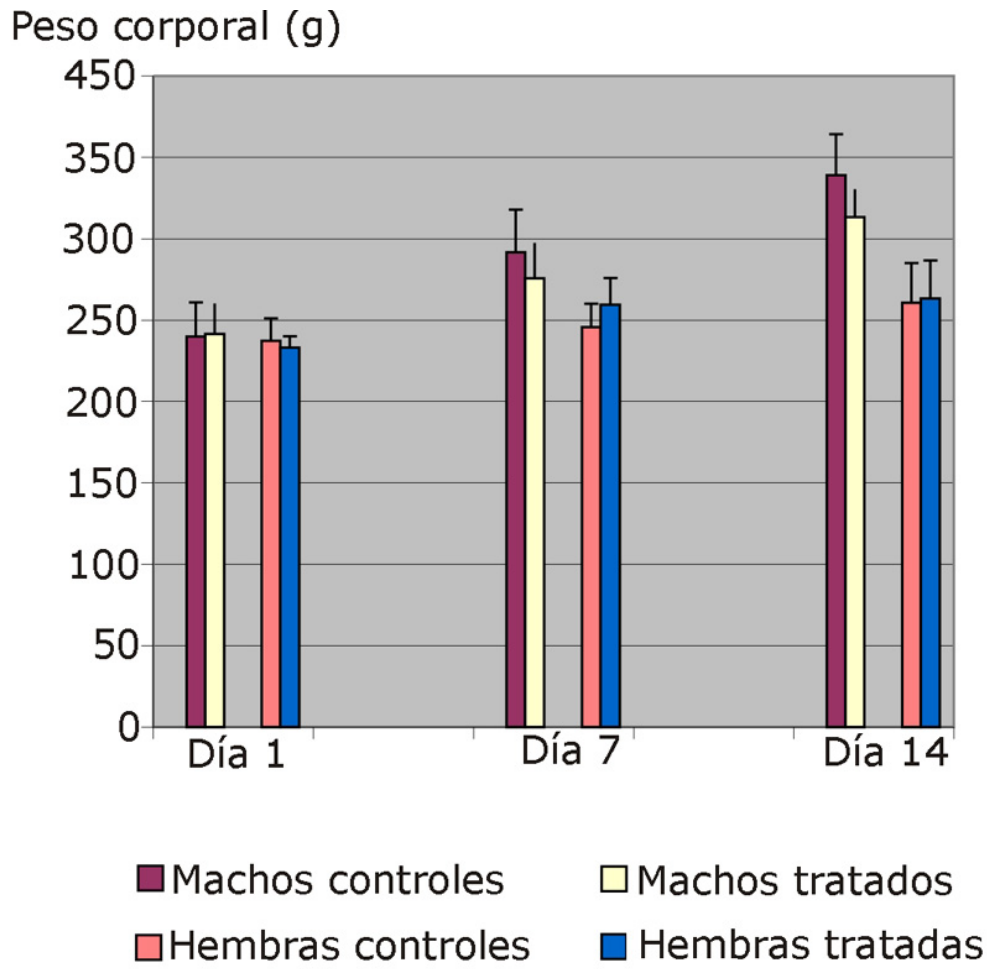


**Fig. 3.** Pesos relativos de órganos. Estudio de toxicidad aguda.

### Ganancia de peso

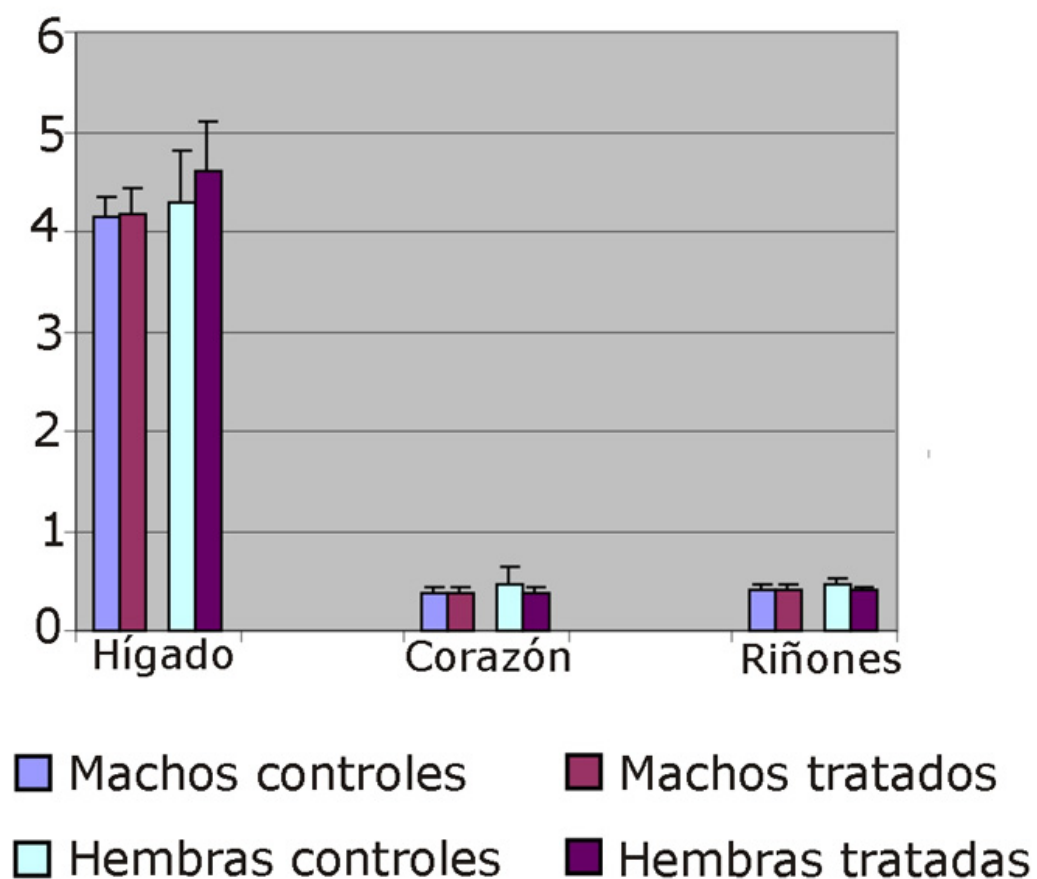


**Fig. 4.** Ganancia de peso en estudio de toxicidad subaguda.



**Fig.5.** Comportamiento del peso corporal en el estudio de toxicidad subaguda.

Peso relativo (g)



**Fig. 6.** Peso relativo de órganos. Toxicidad subaguda.