

Original

Evaluación de la toxicidad por dosis única oral de extractos de *Dichrostachys cinerea* en ratas

Toxicity Evaluation of a Single Oral Dose of *Dichrostachys cinerea* Extract in Rats

Aida Yanet Borges Espinosa ^{1*} <https://orcid.org/0000-0003-3193-2372>

Osmany Marrero Chang ² <https://orcid.org/0000-0003-1508-6014>

Miriesy Seijo Wals ² <https://orcid.org/0000-0002-1288-1672>

Aliette Martínez Díaz ² <https://orcid.org/0000-0002-9987-8213>

Leonel Lazo Pérez ³ <https://orcid.org/0000-0001-7632-4130>

Mario Reinoso Pérez ³ <https://orcid.org/0000-0001-5825-6234>

¹ Departamento de Sanidad Animal de Villa Clara. Cuba.

² Laboratorio de Toxicología. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Cuba.

³ Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Cuba.

* Autor para la correspondencia(email): aybe5@nauta.cu

RESUMEN

Antecedentes: El uso de la biomasa comestible de *Dichrostachys cinerea* podría ser una alternativa eficaz para el control de parasitosis en animales.

Objetivo. Evaluar la toxicidad a dosis límite de un extracto de legumbres, rebrote y hojas de planta adulta de *D. cinerea* en ratas.

Métodos: Se utilizaron ratas adultas jóvenes de la especie *Rattus norvegicus* (variedad albina), de la línea o cepa Sprague Dawley (Cenp: SD), de ambos sexos, con un peso entre 150 y 200 g, consanguíneas y heteroxénicas. Se evaluaron tres extractos acuosos mediante maceración al 20% de biomasa vegetal de, rebrotes, hojas de planta adulta y legumbres, mediante el ensayo de toxicidad oral por dosis límite de 2000 mg / kg de masa corporal. Se controló la ocurrencia de mortalidad y la aparición de síntomas o signos de toxicidad. Se practicó necropsia y análisis macroscópico a los animales al final del estudio en busca de lesiones. Se empleó el paquete

estadístico STATISTICA, versión 10 y se aplicaron los ensayos no paramétricos de Pares de Wilcoxon y U de Mann Whitney, para comparar el peso inicial y final por sexos y el incremento por sexos, respectivamente.

Resultados: Las ratas de ambos sexos incrementaron su masa corporal, lo que demuestra la no influencia negativa por la administración del extracto. Se observó diferencias significativas en el incremento de peso entre hembras y machos, no se observaron lesiones macroscópicas o alteraciones patológicas relacionadas o achacables a la administración del producto.

Conclusiones: El extracto acuoso de legumbres, rebrote y hojas de la planta *D. cinerea*, no resulta tóxico a dosis límite oral en ratas.

Palabras clave: dosis límite, legumbre, planta, rebrote (*Fuente: BVS*)

ABSTRACT

Background: The utilization of edible biomass of *Dichrostachys cinerea* could become an effective alternative for the control of animal parasitosis.

Aim. To evaluate toxicity at a limit dose of an extract of legumes, reshoots, and leaves of adult *D. cinerea* plants in rats.

Methods: The study comprised young-adult albino consanguineous and heteroxenic rats (*Rattus norvegicus*) of the Sprague Dawley (Cenp: SD) line, of both sexes, weighing between 150 and 200 g. Three aqueous extracts by 20% crushing from plant biomass, reshoots from the adult plants, and legumes were evaluated through an oral toxicity test with a limit dose of 2000 mg/kg body mass. Mortality and symptoms or signs of toxicity were controlled. A necropsy and microscopic analysis of the animals at the end of the study was performed to detect lesions. STATISTICA, version 10, was used, and the Wilcoxon and Man Whitney U non-parametric paired tests were performed to compare the initial and final weights by sexes, and weight gains by sexes, respectively.

Results: The rats from both sexes increased their body weight, demonstrating that the extract caused no negative effect. There were significant differences in weight gains between the males and females; no macroscopic lesions or pathological alterations associated with the administration of the product were observed.

Conclusions: The aqueous extract of legumes, reshoots, and leaves of adult *D. cinerea* plants administered to rats orally was not toxic at the limit oral dose in rats.

Keywords: limit dose, legume, plant, reshoots (*Source: BVS*)

Recibido: 6/6/2022

Aceptado: 14/7/2022

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas cuatro décadas se han desarrollado moléculas sintéticas antiparasitarias de gran eficacia, amplio espectro y bajo efecto residual (Dorta-Contreras, 2007). Sin embargo, en la actualidad el tratamiento de enfermedades parasitarias se ha complicado debido a la resistencia a

fármacos comerciales por lo que es necesario utilizar alternativas para el control de estos patógenos resistentes o multiresistentes, una de las cuales puede ser el uso de metabolitos secundarios de plantas con actividad antibacteriana y/o sobre nematodos gastrointestinales (Satyajit y Lutfun, 2012; Epe y Kaminsky, 2013; Medina *et al.*, 2014; Hernández-Alvarado *et al.*, 2018).

Existen numerosas investigaciones que han abordado el estudio del potencial nutracéutico de diversas plantas, entre ellas *D. cinerea*, cuyo uso aún no se ha extendido en Cuba. Particularmente se señala su efectividad en el control de nematodos gastrointestinales (Arece *et al.*, 2012) por lo que resulta válido asumir que el uso de la biomasa comestible de esta planta podría ser una alternativa eficaz para el control de parasitosis en pequeños rumiantes.

Los estudios toxicológicos y farmacológicos de corte experimental constituyen un paso de la ruta crítica por la que necesita transitar un nuevo producto, nutracéutico u otros, para su establecimiento sobre bases científicamente sustentadas que aporten los criterios de seguridad, consumo y disposición del producto en estudio (Repetto y Repetto, 2012). El uso de preparados obtenidos de *D. cinerea* requieren de la necesidad de caracterizar su seguridad toxicológica.

El objetivo del estudio fue evaluar la toxicidad a dosis límite de tres extractos de legumbres, rebrote y hojas de planta adulta de *D. cinerea* en ratas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Toxicología del Departamento Biológico del Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.

Identificación de las sustancias de ensayo y del vehículo

Nombre de los productos:

Extracto acuoso de legumbres de *D. cinerea* (L.)

Extracto acuoso de rebrotes de *D. cinerea* (L.)

Extracto acuoso de hojas de plantas adultas de *D. cinerea* (L.)

Obtención: Extracto acuoso mediante maceración al 20% de biomasa vegetal consistente en legumbres, hojas de la planta adulta y de sus rebrotes colectadas en una misma área y época del año. El material vegetal se obtuvo de las legumbres, hojas de la planta adulta y de sus rebrotes de *D. cinerea* establecidas en áreas pertenecientes a la Cooperativa de Créditos y Servicios “El Vaquerito”, ubicadas en la carretera a Camajuaní km 2.5, Santa Clara, provincia de Villa Clara, Cuba.

Características organolépticas:

- Color: Pardo verdoso oscuro

- Apariencia: Líquido fluido.
- pH: 6.6

Sistema de ensayo

Se utilizaron Ratas jóvenes de la especie *Rattus norvegicus* Berkenhout 1769 (variedad albina), de la línea o cepa Sprague Dawley (Cenp:SD), de ambos sexos, con un peso entre 150 g y 200 g, consanguíneas y heteroxénicas. El peso se verificó con una balanza técnica digital, marca Sartorius, ubicada en el mismo local de tenencia y alojamiento de los animales. Las hembras fueron nulíparas y no gestantes. La variación de peso de los animales utilizados en el ensayo no excedió de $\pm 20\%$ de la media del peso para cada sexo.

Los animales fueron asignados aleatoriamente al grupo experimental. Al finalizar el estudio los animales fueron sacrificados mediante el método eutanásico de concusión. Se evitó todo sufrimiento innecesario y se tuvo en consideración principios y procedimientos bioéticos.

Las condiciones de mantenimiento y alimentación, alojamiento y adaptación, el procedimiento de identificación y la limpieza y desinfección se realizaron teniendo en cuenta los procedimientos que aseguraran el bienestar de los animales. El agua de beber suministrada fue agua potable previamente esterilizada por autoclaveo. El acceso al agua y los alimentos fue *ad libitum* durante todo el estudio.

Las condiciones ambientales fueron: Temperatura $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, Humedad relativa: 50% a 70%, Ciclos luz-oscuridad: 12 / 12 horas e Intensidad luminosa: 200 lux a 250 lux. Dichas variables climáticas se mantuvieron mediante aires acondicionados, extractor de aire, sistema automatizado de apagado y encendido de luz fluorescente debidamente programado.

Distribución y formación de grupos experimentales

De los animales que fueron declarados como aptos para el estudio, se asignaron aleatoriamente a cada grupo experimental diez ratas necesarias. A cada grupo experimental se le asignaron cinco ratas de cada sexo. Los animales de igual sexo permanecieron en cajas de policarbonato tipo T-3 con cama de bagazo y bajo las mismas condiciones de tenencia durante todo el ensayo. Dichas cajas se identificaron en la tapa de rejilla metálica correspondiente.

El diseño y conformación de los grupos experimentales se muestra en la **tabla 1**.

Tabla 1. Grupos experimentales.

Grupos	n y sexo	Dosis
Extracto hojas de planta adulta	5 hembras	2000 mg / kg masa corporal
	5 machos	
Extracto rebrotes	5 hembras	
	5 machos	
Extracto legumbres	5 hembras	
	5 machos	

Vía de administración, dosis, frecuencia y duración

Vía de administración: los animales se administraron por vía oral mediante una cánula rígida de acero con un engrosamiento en la punta para evitar perforaciones esofágicas en los animales al momento de la administración. Los animales estuvieron en ayuna durante la noche anterior al inicio del ensayo. Posteriormente en la mañana se pesaron y se les administró la sustancia de ensayo acorde al peso corporal. Se continuó el ayuno por tres a cuatro horas posteriores, tras las cuales se repuso el alimento. El agua de bebida nunca se retiró de las cajas de los animales en ensayo.

Dosificación: Se administró el producto a una dosis límite establecida internacionalmente para productos en estudio cuya composición o datos experimentales previos hagan suponer que esta provocará ninguna o muy poca toxicidad. El volumen de extracto que se administró correspondió a una dosis de 2000 mg / kg de masa corporal.

Observaciones clínicas

Los animales administrados se observaron a simple vista durante las primeras 3-4 horas después de la administración, donde se observó la ocurrencia de mortalidad o la aparición de síntomas o signos de toxicidad. Posteriormente se realizaron observaciones uno o dos veces por día, por 14 días.

Al finalizar el período de observación de 14 días, a los animales se les practicó el sacrificio por el método de concusión de eutanásico de concusión y se les realizó análisis macroscópico patológico.

Peso corporal

Se pesaron los animales al inicio del estudio y cada 7 días post-administración con una balanza técnica digital, marca Sartorius. Las variaciones de peso se calcularon y registraron cuando la supervivencia fue superior a 1 día. También se evaluó la ganancia de peso corporal hasta que terminara el período de observación post administración.

Estudio anatomopatológico

Se practicó necropsia y análisis patológico macroscópico a los animales al final del estudio en busca de lesiones y alteraciones macroscópicas.

Consideraciones éticas

El estudio consideró los principios de reducción del número de animales al no tener que emplear animales controles y utilizar el mínimo número de ratas para este tipo de estudio. El personal que ejecutó el estudio fue calificado en el uso de mamíferos de laboratorio y tuvo en cuenta los procedimientos que disminuyen el stress, el distress y el deterioro del estado higiénico sanitario, de modo tal que se garantizó durante el estudio el bienestar de los animales mediante el mantenimiento de las condiciones de tenencia para la especie, la no-variabilidad en las respuestas y la validez y confiabilidad de los datos que se generaron.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis no paramétrico mediante el estadístico U de Mann Whitney para comparar el incremento de los pesos por sexo al inicio y al finalizar el estudio y una prueba de pares de Wilcoxon para comparar los pesos del inicio con los del final por sexo. El nivel de significación estadística fue de $p \leq 0,05$. Los estudios fueron realizados mediante el paquete estadístico STATISTICA, versión 10.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se utilizaron en el ensayo 15 ratas de cada sexo, clínicamente sanas y aptas para este tipo de estudio las cuales no presentaron mortalidad ni ningún síntoma clínico que se asociara con la administración del extracto acuoso de legumbre, rebrote y hojas de plantas adultas de *D. cinerea* en los animales de ambos sexos.

El peso de los animales durante el estudio se comportó de manera creciente y lógica, de acuerdo con el tiempo de duración del experimento.

La **tabla 2** muestra que los animales en los que les fue administrado el extracto acuoso de legumbres, rebrote y hojas de planta adulta por vía oral; el peso promedio inicial, el peso promedio final y el incremento de peso vivo fueron mayores en las ratas del sexo macho.

Tabla 2. Comportamiento del peso promedio (\pm DE) en ratas del estudio de toxicidad oral de los extractos acuosos de legumbres, rebrote y de la hoja de planta adulta *D. cinerea*

Tratamientos	n	Sexo	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Incremento de peso (g)
Legumbres	5	Machos	199,6 \pm 13,97	235,8 \pm 9,23	135 \pm 8,15
	5	Hembras	180,2 \pm 3,42	234,6 \pm 17,31	55,6 \pm 8,50
Rebrote	5	Machos	199,8 \pm 5,89	329,6 \pm 12,34	129,8 \pm 7,82
	5	Hembras	176,4 \pm 8,82	239,6 \pm 9,50	63,2 \pm 10,25
Hojas de Planta adulta	5	Machos	204,8 \pm 6,94	311,2 \pm 11,45	106,4 \pm 11,08
	5	Hembras	202,4 \pm 8,56	250,6 \pm 12,81	48,2 \pm 6,30

El análisis estadístico de la evolución de la masa corporal de las ratas administradas con cada extracto demostró la existencia de diferencias estadísticas significativas para un nivel de significación de $p \leq 0,05$, al comparar los pesos iniciales y finales por sexos. Para ambos sexos siempre el peso fue significativamente superior al finalizar el estudio lo que demuestra un incremento positivo de este indicador de salud en las tres evaluaciones (**Fig. 1**).

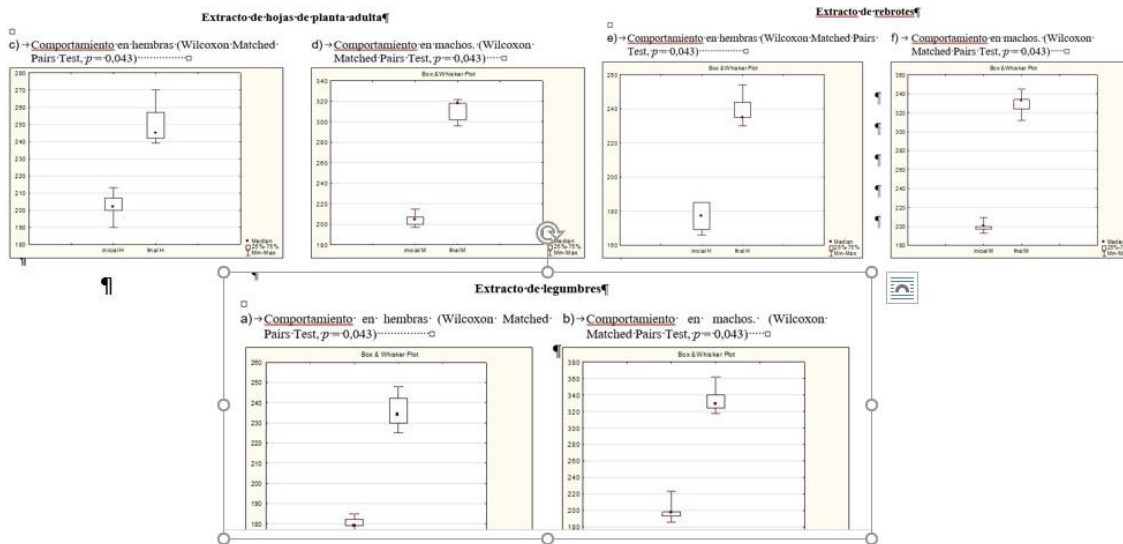


Fig. 1. Análisis del comportamiento del peso corporal de ratas administradas con extractos de *D. cinerea*. Comparación del peso por sexo al inicio y al final del estudio.

En cuanto al análisis realizado a la comparación del incremento de peso corporal por sexos en los tres extractos, se demostró que existieron diferencias significativas para un nivel de significación de $p \leq 0,05$, a favor de las ratas machos sobre las del sexo hembras (**Fig. 2**).

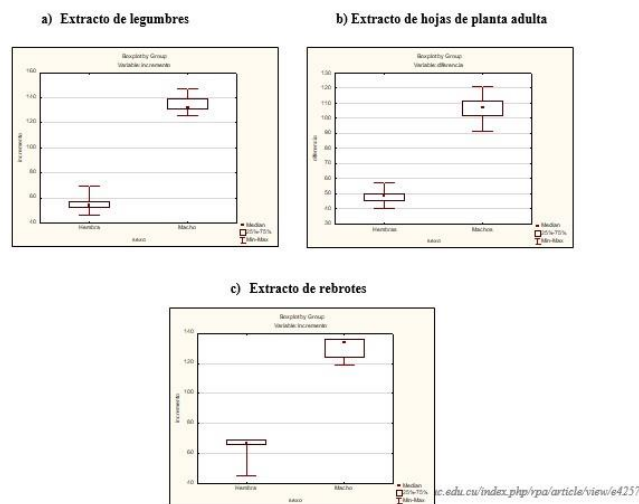


Fig. 2. Análisis del incremento del peso corporal de ratas administradas con extractos de *D. cinerea*. Comparación entre sexos (Mann-Whitney U Test, $p = 0,012$).

De manera general las ratas de los diferentes sexos incrementaron su masa corporal de manera significativa al finalizar el estudio con respecto al inicio, comportamiento normal para el período

de desarrollo somático en que se encontraban y que demuestra la no influencia negativa por la administración de los extractos en estudio.

Hubo diferencias significativas para el incremento de peso entre hembras y machos, comportamiento normal para esta especie y línea de rata. Dicho comportamiento del peso, correlacionado con la edad de los individuos y con diferencias entre sexos, fue verificado al comparar los pesos con los reportados por el Centro de Recursos Animales (*Animal Resources Centre*) en el Departamento de Información de Referencias de Roedores (*Rodent Reference Information*), para animales de la misma línea y edad de ratas (Animals Resources Centre, 2021).

En las necropsias realizadas a la totalidad de los animales que se sacrificaron al finalizar el período de exposición, no se observaron lesiones macroscópicas indicativas de alteraciones patológicas ni atribuibles a la administración del producto.

Varios investigadores refieren efectos terapéuticos en el uso de *D. cinerea* como medicina alternativa (cicatrizante, emético, antiinflamatorio, y vermífugo entre otros), a través de diferentes formas y partes de la planta (Borges *et al.*, 2020).

El amplio uso de diferentes formas de preparación obtenidas de diferentes partes de la planta *D. cinerea* complementa la ausencia de toxicidad demostrable al administrar dosis límites del extracto acuoso, por lo cual se declara como seguro para el uso previsto.

CONCLUSIONES

El extracto acuoso de legumbres, rebrote y hojas de la planta *D. cinerea*, no resulta tóxico a dosis límite oral en ratas.

REFERENCIAS

- Animals Resources Centre. (2021). [Rodent Reference Information](http://www.arc.com/Animal_Resources_Centre/Rodent_Reference_Information/Rat_and_Mice_Weights.htm). Rat and Mice Weights. [http://www.arc.com/Animal Resources Centre/Rodent Reference Information/Rat and Mice Weights.htm](http://www.arc.com/Animal_Resources_Centre/Rodent_Reference_Information/Rat_and_Mice_Weights.htm)
- Arece, J., Roche, Y., López, Y., & Molina, M. (2012). Efecto *in vitro* del extracto acuoso de *Dichrostachys cinerea* (L.) Wight & Arn. en el desarrollo de las fases exógenas de estrongílidos gastrointestinales de ovinos. *Pastos y Forrajes*, 35(3), 301-310. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403942012000300006&lng=es&tlng=es
- Borges Espinosa, A. Y., Reinoso Pérez, M., Espinosa Ruiz, R., & Avello Oliver, E. (2020). Actividad antihelmíntica “in vitro” de extractos acuosos obtenidos a partir de la biomasa comestible de *Dichrostachys cinerea* (L.) Wight et Arn. *Revista de Producción Animal*, 32(2), 92-102.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S222479202020000200092&Ing=es&tIng=es

- Dorta Contreras, A. J. (2007). Aporte de Cuba al estudio de *Angiostrongylus cantonensis*. *Acimed*, 16(4), 0-0. http://bvs.sld.cu/revistas/aci/vol16_4_07/aci0710-07.htm
- Epe, C., & Kaminsky, R. (2013). New advancement in anthelmintic drugs in veterinary medicine. *TRENDS in Parasitology*, 29(3):129-134. https://www.researchgate.net/publication/235396471_New_advancement_in_anthelmintic_drugs_in_veterinary_medicine
- Hernández-Alvarado, J., Zaragoza-Bastida, A., López-Rodríguez, G., Peláez-Acero, A., Olmedo-Juárez, A., & Rivero-Perez, N. (2018). Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria. *Abanico veterinario*, 8(1), 14-27. <https://doi.org/10.21929/abavet2018.81.1>
- Medina, P., Guevara, F., La O, M., Ojeda, N., & Reyes, E. (2014). Resistencia antihelmíntica en ovinos: una revisión de informes del sureste de México y alternativas disponibles para el control de nemátodos gastrointestinales. *Pastos y Forrajes*, 37(3), 257-263. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403942014000300001&Ing=es&tIng=es
- Repetto, J.M., & Repetto, K.G. (2012). Toxicología fundamental. Cuarta Edición. Ediciones Díaz de Santo. 43 Pp. https://www.academia.edu/32600500/Toxicologia_Fundamental_Repetto_4a_Edici%C3%B3n
- Satyajit, D.S., & Lutfun, N. (2012). An Introduction to Natural Products Isolation. En: Satyajit DS, Lutfun N. (eds.). *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology* (3ra ed.). UK: Humana Press Inc., 864, 2-3. https://experiments.springernature.com/articles/10.1007/978-1-61779-624-1_1

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Concepción y diseño de la investigación: AYBE, OMC, MSW, AMD, LLP, MRP; análisis e interpretación de los datos: AYBE, OMC, MSW, AMD, LLP, MRP; redacción del artículo: AYBE, OMC, MSW, AMD, LLP, MRP.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses.