

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DETERMINACION DE ACTIVIDAD TOXICA *IN VITRO* DE
PLANTAS DE USO MEDICINAL EN GUATEMALA



QUIMICO BIOLGO

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Guatemala, Marzo de 1996

R.
06
+ (1690)
C.B

JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

| | |
|------------|------------------------------------|
| DECANO | LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR |
| SECRETARIA | LICDA. ELEONORA GAITAN IZAGUIRRE |
| VOCAL I | LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ |
| VOCAL II | LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN |
| VOCAL III | LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE |
| VOCAL IV | BR. ANA MARIA RODAS CARDONA |
| VOCAL V | BR. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA |

DEDICO ESTA TESIS

- A: Mi Creador por conceder las peticiones de mi corazón.
- A: Mi Patria, Guatemala.
- A: La Faculta de Ciencias Químicas y Farmacia.
- A: Mis Padres, por su amor y apoyo constante.
- A: Mis hermanos Jenny y Manuel.
- A: Mis sobrinos Carlos Eduardo y Diego Josué.
- A: Mis compañeros y amigos: Flor de María León, Dina Cruz, German Guzmán, María Paula de León, Dr. Tetsuo Yanagi, Dr. Julio Cáceres y Licda. María del Carmen Bran.

AGRADECIMIENTOS

- A: Lic. Armando Cáceres por su asesoría y apoyo.
- A: Al Laboratorio y Droguería de Productos Farmacéuticos FARMAYA, S.A. por el financiamiento del presente trabajo.
- A: La Licda. Elsita Jauregui por su valiosa colaboración.
- A: A toda persona que de alguna forma colaboraron para la elaboración de este trabajo.

INDICE

| | | |
|-------|---|----|
| I. | Resumen | 1 |
| II. | Introducción | 3 |
| III. | Antecedentes | 4 |
| | A. Validación de plantas Medicinales | 4 |
| | B. Importancia de la toxicidad de productos naturales | 15 |
| IV. | Justificación | 22 |
| V. | Objetivos | 23 |
| VI. | Hipótesis | 24 |
| VII. | Materiales y Métodos | 25 |
| VIII. | Resultados | 30 |
| IX. | Discusión de resultados | 32 |
| X. | Conclusiones | 35 |
| XI. | Recomendaciones | 36 |
| XII. | Referencias | 37 |
| XIII. | Anexos | 45 |

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

I. RESUMEN

Las drogas naturales extraídas de plantas pueden igualar a las mejores medicinas, ya que la apropiada extracción de sus productos es una fuente potencial de medicamentos a la cual se le evalúa para evidenciar farmacológicamente los componentes biológicos, así como su actividad tóxica y potencial mutagénico.

Este trabajo se realizó con el propósito de contribuir al estudio toxicológico de las plantas medicinales. Para ello se seleccionaron las diez plantas más utilizadas de 116 de uso terapéutico comprobado.

El estudio tóxico se realizó por medio del bioensayo con *Artemia salina*, el cual es un método que permite determinar concentración letal 50% (CL₅₀). La larva de este crustáceo es altamente sensible a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas, por lo que se tiene como un modelo animal para este tipo de estudios. La CL₅₀ de cada uno de los diez extractos etanólicos se estableció por medio de enfrentar nauplios de *A. salina* a extracto de la planta.

Las larvas de camarón salino se obtuvieron colocando huevos deshidratados de *A. salina* en agua marina por 48 hr a temperatura ambiente y fuente de luz artificial. A las 48 hrs de vida se enfrentaron con una concentración inicial de 2 mg/ml (concentración final de 1,000 ppm). Los extractos que presentaron más del 50% de nauplios muertos a esta concentración fueron evaluados a tres diluciones más: 500 ppm, 250 ppm y 125 ppm. Con un total de tres repeticiones por dilución.

Esto se realizó por medio del micrométodo utilizando microplacas de fondo plano a las 24 hrs se hizo recuento de larvas vivas y larvas muertas. Cada uno de estos datos fueron procesados por el programa Finney y de esta manera se obtuvo valores de CL₅₀, estableciéndose que valores menores de 1,000 ppm eran considerados tóxicos. De las diez plantas

evaluadas únicamente dos presentaron valores menores de 1,000 ppm, siendo éstas: *Solanum americanum* con 220 ppm y *Lippia dulcis* con 660 ppm.

Por medio de este estudio se pudo concluir que el bioensayo micrométrico de *A. salina* es útil para realizar un tamizaje, que divida las plantas en tóxicas y no tóxicas. El significado de su positividad es múltiple y deberá evaluarse con otras pruebas de toxicidad.

II. INTRODUCCION

Guatemala posee una gran variedad de plantas medicinales que constantemente son usadas por la población, con el afán de combatir algunas enfermedades. Se ha visto que muchas veces el uso es injustificado, desmedido y sin ninguna precaución, no sabiendo así el verdadero efecto biológico de éstas, ni sus consecuencias.

Existen un gran número de plantas a las que se les atribuyen distintos usos populares en Guatemala, de las cuales solamente a un porcentaje se les ha comprobado alguna de sus propiedades terapéuticas atribuídas. Tomando en cuenta cuales son las más usadas por sus diferentes acciones curativas y de las cuales se tienen datos de laboratorio, se seleccionaron diez plantas a las cuales se les evaluó *in vitro* su efecto tóxico haciendo uso del bioensayo con *Artemia salina*.

El bioensayo micrométrico con *A. salina* es un método que permite realizar un tamizaje, que divide las plantas en tóxicas y no tóxicas, ya que la larva de este crustáceo es altamente sensible a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas, la toxicidad se expresa como concentración letal 50% (CL₅₀) (1).

El bioensayo de *A. salina* demostró ser rápido sencillo de realizar y lo más importante de bajo costo y reproducible. La ventaja de este método radica en la facilidad de eclosión de los huevos de *A. salina*, el crecimiento rápido de sus nauplios y el mantenimiento relativamente fácil de una población en condiciones de laboratorio. Esto permite que el camarón salino sea un modelo animal simple y efectivo para evaluar toxicología (2,3).

III. ANTECEDENTES

A. Validación de plantas medicinales nativas

Existen 600 plantas a las que se les atribuyen distintos usos populares en Guatemala, de las cuales sólo 116 se les ha comprobado alguna de sus propiedades terapéuticas atribuídas. Tomando en cuenta cuales son las más usadas por sus acciones curativas y de las cuales se tienen datos de laboratorio se escogieron diez plantas con el propósito de determinar su actividad tóxica.

A continuación se describen brevemente.

1. Nombre científico: *Bixa orellana* L. Familia: Bixaceae

Sinónimos: *Bixa americana* Poir

Nombres populares: Achiote, uajachote, kurub, xayau (quekchí).

a) Descripción botánica y habitat:

Arbol de 3-9 m de altura. Hojas delgadas y acorazonadas, 8-20 cm de largo y 4-15 cm de ancho. Flores de 4-5.3 cm de ancho, con 5 pétalos blancos o lila, cáliz peludo. Semillas numerosas en celdas separadas de 5 mm de largo, cubiertas de una fina pulpa naranja.

Nativo del continente americano, se ha descrito desde México hasta Bolivia en alturas hasta de 1,000 metros sobre el nivel del mar (4).

b) Composición química:

El extracto acuoso de la pulpa roja de la semilla contiene 1,000-2,000 UI de vitamina A por gramo, proteínas, β -caroteno y otros carotenoides (5). El tamizaje fitoquímico indica la presencia de aminas, flavonoides, leucoantocianinas, triterpenos y taninos. En las hojas se informa la presencia de algunos alcaloides supuestamente tóxicos no caracterizados, flavonoides y un hidrocarburo sesquiterpénico tetracíclico llamado ishwarano (6).

c) Farmacología:

El extracto acuoso de la raíz posee actividad hipotensora y antisecretoria; los extractos acuosos y clorofórmicos de las semillas tienen actividad hipoglucemiante (5). La maceración etanólica de la raíz posee actividad contra *Salmonella typhi* y *Trichomonas vaginalis* no así contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenteriae* y *S. flexneri* (7,8). El alto contenido de vitamina A podría explicar su acción sobre afecciones de la piel y quemaduras (9).

2. Nombre científico: *Tagetes lucida* Cav. Familia: Compositae (Asteraceae)

Sinónimos: *Tagetes florida* Sw.

Nombres populares: pericón, l'yá, Jolomocox, ucá

a) Descripción botánica y habitat:

Hierba glabra y erecta, 30-95 cm de alto, se levanta desde una base corta y gruesa; cimosamente ramificada. Hojas expuestas, oblongo-lanceoladas, 5-10 cm de largo, puntiagudas, con numerosas glándulas oleosas. Flores amarillas en pequeñas cabezuelas terminales (6,10).

Nativa de México a Honduras en bosques de encino y laderas de 1,000-2,000 msnm. Abundante en la época de lluvia, desaparece en la época seca (10).

b) Composición química:

Las hojas y flores contienen: aceite esencial (11,12), alcaloides cuaternarios, flavonoides (quercetagetina, patuletina), saponinas, taninos, leucoantocianinas, ácido gálico, poliacetilenos, glicósidos cianogénicos, cumarinas (dimetilalileter de 7-hidroxycumarina, 7-metoxicumarina y 6,7,8-trimetoxicuramina), derivados de tiofeno, α -tertienilo, poliacetilenos (5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienol) (8,11,13-15), dextrina goma, grasas, pectina, tres resinas acídicas, taninos y sales minerales (6,16).

c) Farmacología:

Las hojas y flores son activas contra enterobacterias (*E. coli* enteropatógena (ECEP), *S. dysenterie*, *S. flexneri*, *S. typhi*) (7,16,17) y

Streptococcus pyogenes (8,16,18). El extracto acuoso es activo contra ECEP, *S. enteritidis*, *S. typhi*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. pyogenes* (17,18).

El estudio del espectro de inhibición fue activo contra 60 por ciento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y 15 por ciento de cepas de *S. typhi* (10). La tintura inhibe *Vibrio cholerae*, la mayor actividad se extrajo con n-hexano y la CIM es de 10 mg (19). La tintura de hojas y flores inhibe el crecimiento de *Candida albicans* (16,20), *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Candida stellatoidea* con una CIM de 1-2 mg (8). Las hojas han demostrado actividad contra nemátodos (21).

La actividad biológica se le atribuye a α -tertienilo y herniarina (7-metoxicumarina) que están presentes en las hojas y flores (22).

Popularmente se le atribuye propiedad abortiva (6). La DL_{50} de los extractos con actividad espasmolítica por vía oral es mayor de 100 mg/kg de peso (23). El extracto alcohólico provoca en algunas personas síntomas cardiovasculares (24).

3. Nombre científico: *Senna occidentalis* L. Familia: Leguminosae
Nombres populares: Frijolillo, moquillo, comida de murciélago, cimarrón, hediondo, habilla, furrusca.

a) Descripción botánica y habitat:

Hierba anual o perenne de 1 m o más de alto, hojas de 10-30 cm de largo; racimos axilares, septados de 6-9 mm, flores con pétalos de 2 cm, amarillos; vaina café oscuro de 6-12 cm de largo; 6-9 cm de ancho; semillas ovales, café-olivo de 3-4 mm de largo (4,6).

Crece en bosques secos a húmedos; a veces a lo largo de caminos o cultivos a menos de 1,400 msnm. Distribuída desde el sur este de Estados Unidos, Antillas, México, Centro América, parte tropical de Sur América y trópicos del viejo mundo. (6).

b) Composición química:

Las semillas contienen crisofanol, emodina, cassiolina, α -sitosterol y tres compuestos derivados de 1,4,5-trihidroxixantraquinona (isladicina,

helmintosporina y xantorina) (6) y antraquinonas (25). Las hojas contienen multiocenol 7-ramnósido, jacudin 7-ramnosido, y biantraquinona (26) además contiene glucósidos flavónicos y antraquinonas: crisofanol, emodina, fisción y derivados (5). La raíz contiene flavonoides, fitosteroles y antraquinonas (casiolina, emodina, crisofanol, islandicina, helmintosporina y xantonian) (5).

c) Farmacología:

El extracto alcohólico inhibe el crecimiento de dermatofitos tales como: *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *algodonosa*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *granular* y *Trichophyton rubrum* (8).

La planta entera posee propiedad antiinflamatoria y antihepatotóxica; las hojas y los tallos tienen propiedades hipotensoras. La hoja y semilla muestran propiedades antibióticas. La hoja tiene actividad cardiotóxica por vía oral en el conejo. La vaina fresca es tóxica para el ganado; con signos de degenerescencia muscular y toxicidad hepática y renal (5).

4. Nombre científico: *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud. Familia: Leguminosae
Sinónimos: *Robinia rosea* Mill., *R. maculata* HBK, *R. variegat* Schlecht,
R. sepium Jacq., *Lonchocarpus maculatus* DC, *Gliricidia maculata* Steud.,
G. lambii Fernald., *G. maculata* var. *multijuga* Micheli.

Nombres populares: Madre cacao, kante, kansin, madera negra, madriado, matasarna, sacyab, yaite.

a) Descripción botánica y habitat:

Arbol de 10 m de alto, tronco de 30 cm de diámetro, corteza café oscuro. Hojas lanceoladas, 3-7 cm de largo, pinnadas, 2-15 foliolos, verde en la parte superior y manchas purpura en la inferior. Flores en racimos, 5-10 cm de largo. Vaina de la semilla café oscuro 10-22 cm de largo y 1-2 cm de ancho. Semillas lenticulares.

Nativo de la América tropical en laderas hasta 1,600 msnm, se ha introducido en todo el mundo tropical (4,6).

b) Composición química:

El tamizaje fitoquímico de las hojas indica: alcaloides no cuaternarios, saponinas, esteroides insaturados, flavonoides y polifenoles (27). El duramen contiene flavonoides (isoflavanes, 2 butin (flavonona), isoflavan fenólico, isoflavona (gliricidin 6a), dehidroflavol (sepinol 7a) y β -hidroxidihidrochalcona (gliricidol 9a)) (6,9). Las hojas y corteza contienen flavonoides (2'-o-metilsepiol, sepiol 7,3',4'trihidroflavanona, robinetina) (13), así como ácidos o-cumarínico y melilótico y cumarinas (27).

c) Farmacología:

La decocción de las hojas es activa contra *Microsporium canis* y *T. mentagrophytes*, con CIM de 100-200 mg y actividad fungicida y fungistática (28). La tintura de la hojas es activa contra *Neisseria gonorrhoeae* y un espectro de inhibición de 80 por ciento de cepas patógenas (29).

La tintura de la corteza tiene actividad antiaterogénica, aunque no tiene actividad diurética antimicrobiana y endócrina (30). La decocción de las hojas tiene actividad expectorante (6,9).

Las semillas y raíces son tóxicas a los ratones pero no a las ratas (6,9); la planta se dice tóxica a los caballos, ganado y cabras (6,27).

5. Nombre científico: *Byrsonima crassifolia* L. Kunth. Familia Malpighiaceae

Sinónimos: *Byrsonima cubensis* Juss., *B. karwinskiana* Juss.,

Malpighia crassifolia L

Nombres populares: Nance, chi, craboo, nanche, nazin, tapal, zacpah.

a) Descripción botánica y hábitat:

Arbol de 3-10 m de alto, copa redondeada, tronco recto. Hojas elípticas, 5-20 cm de largo y 4-5 cm de ancho. Flores de 5 pétalos, amarillas, 1-2 cm de ancho. Fruta en drupa, 8-12 mm de diámetro, jugosa, ácida y tiene una semilla negra muy dura (4,6).

Nativo de México, Centro, Sur América y el Caribe en bosques secos de pino-encino y de clima tropical hasta 1,800 msnm. (4,31,32).

b) Composición química:

La corteza tiene 20-30 por ciento de taninos, 2.7 por ciento de ácido oxálico y glucósidos (6,33). El tamizaje fitoquímico de las hojas indica saponinas, esteroides insaturados, cardenólidos, bufadienólicos, flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles (34) y triterpenoides, (birsonimol) (13).

c) Farmacología:

La tintura de la corteza es activa contra enterobacterias (*S. typhi*, *S. flexneri*) (7,17), *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* (8,18,35). Los disolventes que mejor extraen el principio activo son etanol y acetona y la CIM del extracto acetónico para *S. pyogenes* fue de 1 mg (8).

La tintura de la corteza tiene actividad contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. stellatoidea*, con una CIM de 1-2 mg (28).

A la corteza se le atribuye cierta toxicología, aunque no hay estudios específicos (27).

6. Nombre científico: *Psidium guajava* L. Familia: Myrtaceae

Sinónimos: *Psidium pyriferum* L., *P. pomiferum* L.

Nombres populares: Guayaba, cak, ch'amxuy, coloc, patá, posh

a) Descripción botánica y habitat:

Arbol de 10 m de alto, tronco 20-25 cm de diámetro, corteza suave, pubescente. Hojas verdes, elípticas 5-15 cm de largo. Flores axilares, blancas, 3-4 cm de ancho, penacho de 275 estambres. Frutos por fuera granular y firme, al centro suave, lleno de pulpa jugosa.

Nativo de América tropical, sembrado comercialmente en zonas cálidas de África y Asia (36).

b) Composición química:

La planta es rica en taninos (hojas 9-10%, corteza 12-30%) (37). Las hojas contienen grasa (6%), β -sitosterol, ácido maslínico y elágico, aceite esencial (0.1-0.3%) compuesto de triterpenoides (β -cariofileno, β -bisaboleno, aromadendreno, cadaleno, cineol, eugenol, l-limoneno, nerelidol, β -selineno, ácidos oleanólico, ursólico, cratina como guayaverina (3- α -arabo-piranosido y avicularina (3-arabinósido)). El tamizaje fitoquímico del fruto indica: polifenoles, taninos, terpenos, glicósidos esteroidales (cardenólidos, bufadienólicos, saponinas), antraquinonas; el de la raíz indica leucoantocianinas, esteroides y ácido gálico (6,38,39). La corteza contiene elagitaninos (10%), tales como 4-6 hexahidroxidifenilglucosa, telimagrandina I y II, peduncularina, casuarinina, estaquicerina, estrictinina (40).

c) Farmacología:

La tintura de las hojas es activa contra *S. dysenteriae*, *E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus* y *S. pneumoniae* (7,8), *S. flexneri* y *P. aeruginosa*; presenta actividad antifúngica contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. stellatoidea* con una CIM de 1-2 mg (41). La maceración hidroalcohólica inhibe 80 por ciento de cepas de *E. coli*, *S. dysenteriae*, *S. pyogenes* y *S. typhi* (42). El mejor disolvente es etanol y la CIM 5 mg para *S. typhi* y *S. aureus*. (8). El extracto acuoso de raíz y hojas es antibacteriano (43), actividad atribuida a los flavonoides (avicularina, guayaverina y quercetina). En la decocción acuosa de las hojas se encontró actividad únicamente contra *Epidermophyton floccosum* de seis dermatofitos patógenos ensayados (28).

La infusión de las hojas es activa contra *T. vaginalis* (44), lo cual podría atribuirse al ácido psidiólico que tiene actividad antiprotozoaria. Las hojas son activas *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*, (45) y contra hongos fitopatógenos (*Drechslera oryzae*, *Dysdercus cingulatus*, *Ustilago hordei* y *U. tritici*) y virus del mosaico del tabaco (21).

Por su contenido de taninos y su actividad astringente es efectiva en el tratamiento de diarrea, indigestión y espasmo abdominal (9). Al fruto se le atribuye actividad abortiva (6).

7. Nombre científico: *Phlebodium aureum* John Smith. *Polypodium leucotomos* Poir. Familia: Polypodiaceae

Sinónimos: *Polypodium aureum* L.; *P. calahuala* L.

Nombres populares: Calaguala, polipodio

a) Descripción botánica y habitat:

Helecho epífita 8-15 mm de grueso, densamente cubierto con una pelusa dorado-café. Frondas separadas, arqueadas o esparcidas; sobre tallos brillantes, cafés, 15-30 cm de largo. Hojas ovado-oblongas, 30-120 cm de largo, 20-40 cm de ancho, divididas en segmentos puntiagudos (6).

Nativo de Centro América. Crece silvestre en troncos de palmas, árboles de encino y en roca caliza desintegrada, en situaciones de gran humedad. Se encuentra en México, Centro y Sur América (6).

b) Composición química:

El rizoma contiene azúcar, aceite esencial, mucílago, almidón, nitrato de potasio y colorante rojo (46); además contiene calagualina, polipodina, aceites grasos y taninos (47) así como esteroides (ecdisterona y dos ecdisonas como la polipodaureina) (6,13).

c) Farmacología:

El extracto de hojas es activo contra bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas campestris*) (21). La decocción del rizoma produce moderada actividad diurética en ratas (48). En tejidos tumorales, una de sus saponinas (anapsos) reduce la incorporación de nucleoproteínas y precursores, por un mecanismo anabolizante opuesto a la acción de los citostáticos (49). En pacientes con neoplasias avanzadas se ha demostrado que la calagualina produce un ligero aumento de la sobrevivencia sin producir efectos indeseados (50). En voluntarios sanos, la administración de anapsos por vía oral disminuye la respuesta linfoblásticas a la estimulación con mitógenos, los niveles de inmunoglobulinas séricas y la proporción de células T (51). Este efecto ha sido observado en pacientes psoriáticos (52) lo que podría explicar la mejoría clínica observada (53).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIBLIOTECA CENTRAL

8. Nombre científico: *Smilax lundellii* Killip & Morton, Familia: Smilacaceae
Nombres populares: Zarzaparrilla, bejuco de la vida, cocolmea, cuculmea, diente de chucho, palo de la vida.

a) Descripción botánica y habitat:

Enredadera del género *Smilax*. *S. lundellii* es de ramas inferiores firmes, robusta, cilíndricas, estriadas, con espinas fuertes, ramas superiores sin espinas, peciolo de 1-2.5 cm de largo, articulados; rizoma leñoso de color rojo. Hojas lanceoladas, verde-café, inferiores 27 cm de largo. Pedúnculo fructoso de 7-10 mm de largo.

Nativa de México y Centro América en bosques húmedos hasta 1,300 msnm. (54,55).

b) Composición química:

El tamizaje fitoquímico de *S. lundellii* indica la presencia de alcaloides, aceite esencial, esteroides insaturados, glicósidos esteroidales (saponinas, cardenólicos, bufadienólicos, flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles, resinas, azúcares y grasas (54). Se han aislado agliconas esteroidales (sarsapogenina, smilagenina y parrillina), β -sitosterol, stigmasterol, ácido sarsápico (56), otros componentes son polinastanina, ácido paroaparico, resinas, aceites, ácidos grasos (palmítico, esteárico, behénico, oleico y linolénico) (57).

c) Farmacología:

La tintura de la raíz es activa contra *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhi*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* y *S. pyogenes* (48,54), aunque no es activa contra *V. cholerae* (19). Estudios de la actividad antifúngica *in vitro* demuestran que la decocción y el extracto metanólico de rizomas de *S. lundellii* tienen actividad contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. stellatoidea*, con una CIM de 1-2 mg. La decocción de rizoma tienen actividad contra *E. floccosum* y *T. mentagrophytes* (19).

La actividad antimicrobiana se atribuye a las saponinas, pero en particular a sarsapogenina y parillina. La decocción de la raíz y rizoma de *S. lundellii* tiene actividad diurética en ratas comparable a la

hidroclorotiazina (48,54). La sarsasapogenina tiene actividad antiinflamatoria (58).

El extracto líquido de la raíz es de uso oficial en varios países, por su actividad antirreumática, antiséptica y antiprurítica se recomienda para el tratamiento de psoriasis y reumatismo crónico (59). La zarzaparrilla es oficial en la USP desde 1820 (57).

La decocción de las raíces de *S. lundellii* tiene una DL_{50} por vía oral en ratones mayor de 30 g/kg (48,54).

9. Nombre científico: *Solanum americanum* Miller Familia: Solanaceae

Sinónimos: *S. nodiflorum* Jacq.

Nombre populares: Quilete, macuy, hierba mora, chichiquelite.

a) Descripción botánica y habitat:

Hierba de 1 m de alto, tallo pubescente. Hojas lanceoladas 3-14 cm de largo, ápice agudo. Flores en cálices de 1-2 mm, limbo partido, 5-8 mm de ancho, estilo 2.5-3.5 cm de largo. Frutos globosos, 4-8 mm de diámetro; semillas pequeñas.

Nativa de América, crece en matorrales y sembradíos de 350-1,500 msnm. (60).

b) Composición química:

S. americanum contiene alcaloides (solasodina, solasonina, glucoalcaloides) y alcalinas (6).

c) Farmacología:

La decocción de *S. americanum* tiene actividad contra *S. aureus* (17,18). La decocción y tintura de las hojas de *S. americanum* es activa contra *C. albicans* (61) y *Cryptococcus neoformans* (62). La actividad antibiótica fungicida e insecticida del género *Solanum* se atribuye a α -solanina. La α -solanina tiene una DL_{50} de 42 mg/kg por vía intraperitoneal (56).

10. Nombre científico: *Lippia dulcis* Trev. Familia: Verbenaceae
Sinónimos: *Phylla scaberrima* Moldenke; *P. dulcis* Moldenke; *Zapania scaberrima* Juss.

Nombres populares: Orozúz, hierba dulce

a) Descripción botánica y habitat:

Hierba perenne, leñosa en la base, 40-60 cm de alto, tallos estrigosos o glabros. Hojas oblongo-ovadas, 1-6 cm de largo, peludas en la parte inferior, dulce al masticarlas; peciolo de 0.5-1.5 cm; cabezuelas florales, 6 mm de grueso, hasta 3 cm de largo; cáliz mínimo; corola blanca, 1-1.5 mm de largo.

Nativa del sur de México a Panamá en orilla de bosques o riveras de ríos, terrenos abiertos y pastizales hasta 1,800 msnm. (63).

b) Composición química:

El tamizaje fitoquímico de las hojas demostró aceite esencial, ácidos orgánicos, alcaloides, hidrocarburos alifáticos, azúcares y ésteres (64). El compuesto endulcorante es la hernandulcina que representa el 0.004 por ciento de la hierba seca; de existir potencial en su uso, se estima que sería más rentable la industrialización de la molécula de síntesis que la obtenida naturalmente (65).

c) Farmacología:

La tintura de las hojas inhibe *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. aureus* y *S. pneumoniae* (18,41). La *Nueva Materia Médica* y la *Farmacopea Mexicana* la reconocen como demulcente, emenagoga y expectorante, con acción alternativa sobre la mucosa bronquial, (14,65). El principio endulcorante es la hernandulcina, pero su uso es limitado ya que la cantidad presente es baja (65).

El alcanfor presente puede ser tóxico (DL₅₀ de 50 mg/kg); se sabe que cruza la placenta y podría ser la causa de poder abortivo que se le atribuye popularmente (65).

B. Importancia de la toxicidad de los productos naturales

Los recientes descubrimientos fitoquímicos indican que los productos naturales podrían substituir a los derivados del petróleo o productos de síntesis; la apropiada extracción de productos de plantas también han sido fuentes potenciales botanoquímicas, a las cuales, se les evalúa para evidenciar los componentes activos biologicamente, tanto contra bacterias y hongos como su actividad tóxica y su potencial mutagénico (66).

Las drogas naturales extraídas de plantas pueden igualar a las mejores medicinas. Afortunadamente se han descubierto y desarrollado nuevas drogas a base de plantas, lo que se ha logrado por un esfuerzo interdisciplinario entre la Etnobotánica, Farmacognosia, Bioquímica, Química Analítica, Farmacología, Fitoquímica, Farmacéutica y Medicina. Estos productos reciben el nombre de fitofármacos (67).

Es de gran importancia el estudio de estos productos fitofarmacéuticos, ya que se consumen para fines terapéuticos, ingiriendo grandes cantidades por tiempo prolongado, sin saber su efecto biológico real (1).

Se han planteado algunas hipótesis acerca de que la presencia de ciertos materiales de plantas pueden ser agentes tóxicos al hígado cuando éstas son usadas como hierbas medicinales (68). Así mismo se ha evaluado el potencial mutagénico que estas plantas puedan tener, el cual se encuentra asociado a su riqueza en flavonoides y taninos, teniendo algunos de éstos actividad mutagénica (1).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Muchos químicos contenidos en plantas que manifiestan su teratogenicidad en animales han demostrado ser inocuos en humanos. Sin embargo, aún queda por demostrarse si la falta de respuesta en los humanos se deba a sensibilidad disminuída, generalmente debida a niveles de exposición subteratogénicos o a la falta de métodos apropiados para identificar teratógenos humanos. Por otro lado, con excepción de los cumarínicos, aquellas drogas que han sido aceptadas como teratógenos

humanos han demostrado ser teratogénicas en una o más especies de laboratorio. Sin embargo, ninguna especie ha demostrado ser claramente efectiva en la detección de teratógenos humanos (69).

Entre las especies con las cuales se ha experimentado, se encuentran los roedores, la rata y el ratón son los que mejor han ejemplificado la reacción en humanos. La rata es la más utilizada en laboratorio, la susceptibilidad de ésta a supuestos teratógenos ha sido variable. La selección de estas especies se ha basado en su amplia disponibilidad, bajo costo y su largo historial como animal de laboratorio (69).

Los conejos han sido utilizados rutinariamente, como especies no roedoras por la mayoría de las agencias reguladoras y se ha observado que es la especie en la que ocurren con menos probabilidad hallazgos falsos-positivos. Se ha sugerido que el hurón pueda servir como alternativa en lugar del conejo, como especie no roedora, en parte por su similitud con la placenta humana y su utilidad en el estudio de toxicología reproductiva. Entre otras especies menos usadas para pruebas, los primates ofrecen un mayor nivel de predilección que otros. Es de enfatizar que a pesar del paralelismo entre el humano y el mono en lo que concierne a la teratogenicidad no se ha demostrado dicho paralelismo (69).

Con respecto a malformaciones, el ratón y la rata produjeron el mayor número de defectos concordantes, pero igualmente dichas especies fueron las principales responsables de la mayoría de respuestas no concordantes. Ya que no se conocen otras especies más claramente predecibles que éstas, en relación con la similitud con la respuesta humana, se concluye que las decisiones seguras deberán basarse en datos sobre toxicidad reproductiva y del desarrollo a la luz de los parámetros farmacocinéticos, metabólicos y toxicológicos que se conocen de las diferentes drogas (66,68,69).

La extrapolación de datos en animales a humanos es el fundamento en el cual se basa la evaluación de la seguridad de drogas y químicos antes de ser expuestos a humanos (69).

Se considera el hecho de que entre 2,800 químicos que han sido ensayados en animales y que tienen potencial teratogénico únicamente 14 de estos químicos han demostrado tener esta propensión en humanos. Poniéndolo de otra manera, hay más o menos 1,000 químicos que muestran cierta teratogenicidad en animales, de los cuales no se tiene ninguna evidencia de que compartan esta propiedad en humanos. Sin embargo, esta discrepancia únicamente refleja que no podemos reconocer la teratogenicidad en humanos. Al presente existe el dilema de no poder seleccionar la especie animal que más pudiera semejarse al humano (69).

Algunos parámetros de como medir el potencial teratogénico, toxicológico y mutagénico de las sustancias químicas, en los animales de laboratorio han sido: malformaciones estructurales, mortalidad, retardo de crecimiento, índice de fertilidad y/o deterioro funcional (69).

Persiste el hecho de que el único modelo confiable es el hombre. Sin embargo, un número de razones están obviamente en contra de la experimentación directa. Desde mediados y finales de los 60, virtualmente toda especie en el laboratorio ha sido tratada como un modelo en potencia para evaluar teratogenicidad (69).

El punto tradicional para la valoración del potencial teratogénico, es rotundamente las malformaciones estructurales. Sin embargo, es posible que un químico dado pueda matar al feto más bien que malformarlo bajo cierta dosis, en una especie, mientras que pueda resultar en malformación bajo la misma dosis en otra especie. Quizá una mejor correlación entre el laboratorio y el humano pueda obtenerse a través de la colección y el análisis de todos los fundamentos del desarrollo toxicológico (69).

Entre los métodos que utilizan a especies vivientes para evaluar el efecto tóxico de los medicamentos o productos naturales se encuentra el método del camarón salino *A. salina*. Es un bioensayo natural simple por medio del cual, se determinan valores de CL_{50} en mg/ml de componentes activos de extractos en medio salino (70).

Muchos componentes nuevos están siendo aislados, caracterizados y publicados sin una prueba biológica previamente realizada que garantice su efecto inofensivo (70).

En la ambición por la búsqueda de actividades específicas en plantas, muchas veces se pasa por alto otros usos o actividades las cuales no son detectadas o son ignoradas en el proceso del tamizaje. Tomando en cuenta que algunas plantas con principios activos son tóxicas en elevadas dosis, es necesario hacer incapie en una evaluación cuidadosa y completa de éstas; haciendo uso del ensayo del camarón salino, siendo éste un instrumento para detectar la actividad citotóxica en plantas o compuestos químicos naturales y siendo utilizado como una guía del tamizaje fitoquímico y fraccionario (70,71).

En vez de que cada sustancia tenga que ser aislada y analizada por una batería de bioensayos específicos y sofisticados; se desea un bioensayo rápido, barato por medio del cual se pueda hacer un tamizaje y monitoreo de fraccionamiento para los extractos de plantas con actividad fisiológica, se tiene que utilizar un pequeño crustáceo, camarón salino, como el instrumento del bioensayo general (70).

El camaron salino es un crustáceo perteneciente a la subclase Branchiopoda, orden Anostraca. Este se encuentra distribuido en todo el mundo en rangos de salinidad altos. Esta tolerancia de salinidad entre 10-20 a 18-20 gr/l hace que el animal sea relativamente fácil de cultivar y ser estudiado. En condiciones ultrasalinas existen menos competidores o depredadores y esto probablemente explica el éxito de *Artemia* en la enorme estabilidad de poblaciones en lagos o pozos salinos. Los huevos de

camarón salino (*A. salina*) son realmente ventajosos por su bajo costo en ventas de comida y pescados tropicales y ellos se mantienen viables muchos años en estado seco. Los huevos pueden ser almacenados por un largo período por estar deshidratados. Al ponerlos en solución marina los huevos absorben el agua y se inicia la embriogénesis, esta es completada entre 16 a 20 h después de la inmersión. La embriogénesis ocurre en una membrana de empollamiento inmóvil, luego de desarrollarse rompe la membrana y se libera como nauplio activo. Estas larvas están consideradas como estado I o estado II. En todos los estadios de crecimiento del camarón salino, es indicativo de vida activa por movimiento de antenas y mandíbulas (2,66,70).

El camarón salino ha sido utilizado para ensayos o análisis de residuos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos, toxinas dinoflagelares y oxinas en ambientes marinos. En estudio de monitoreo de fraccionamiento, el camarón salino previamente a mostrado utilidad con extractos de hongos directamente aislados de micotoxinas (70). Este organismo es ahora el indicado para una conveniente prueba para actividades farmacológicas en extractos de plantas, los cuales pueden manifestar toxicidad con respecto a los nauplios recién nacidos (66,67,70).

Tomando en cuenta que muchas veces la forma de evaluar los efectos tóxicos o teratogénicos en los animales de laboratorio es por medio de observaciones histológicas detectando cambios en la estructura celular, inhibición de crecimiento celular o bien cambios en las cadenas de ADN; existen ensayos que se llevan a cabo utilizando líneas celulares específicas en las cuales, se puede evaluar el efecto citotóxico o mutagénico de los extractos de plantas (69).

Entre los ensayos detectores de citotoxicidad se encuentra el uso de las líneas celulares, como por ejemplo: (70,72)

L-1 (Cáncer humano de pecho)

Col 2 (Cáncer humano del colon)

HT 1080 (Linfosarcoma humano)

KB (Cárcinoma nasofaríngeo humano)
KB-VI (Resistente a droga KB)
Lu1 (Cáncer humano del pulmón)
Mel 2 (Melanoma humano)
P-338 (Linfocitos con leucemia murina)

Los cultivos de células KB han surgido como el principal predictor de actividad contra tumores de importancia, de nuevos compuestos aislados. Esto es probablemente porque muchos de los agentes antitumorales son también citotóxicos y mientras la prueba KB es más sensible que las pruebas *in vivo*, se es capaz de detectar compuestos citotóxicos en una mezcla, así como en extracto crudo o fracción donde la actividad *in vivo* puede ser oscura (73).

En el laboratorio de bioensayo del Instituto de Oncología y Radiología de Cuba, se lleva a cabo un sistema de tamizaje de productos provenientes de plantas, organismos marinos y sintéticos, que sigue una organización sobre la base de un diagrama de flujo y con criterios *a priori* de aceptación o rechazo para cada sustancia (73).

El tamizaje para todos los productos se inicia por el estudio de su actividad citotóxica *in vitro* sobre cultivo de células KB de carcinoma humano, es decir, que la primera evaluación biológica que se lleva a cabo con un producto es su actividad sobre un sistema celular y los productos se clasifican de acuerdo con el valor de la dosis efectiva que inhibe el crecimiento celular en el 50 por ciento (DE_{50}), tomando como criterio de citotoxicidad aquéllos que tengan un $DE_{50} < 20$ mg/ml (73).

Otro procedimiento de ésta índole, pero que aún no ha sido desarrollado rutinariamente, es el llamado ensayo del disco de papa; este muestra considerables promesas para su uso. Consiste en observar la inhibición de agallas de tumores inducidos en papas por discos de *Agrobacterium tumefaciens*. Este microorganismo Gram negativo contiene un plásmido Ti (inductor de tumores) que porta la información genética

IV. JUSTIFICACION

Las plantas contienen principios activos que tienen una acción terapéutica definida, por lo que son empleados para modificar favorablemente los trastornos patológicos originados por las enfermedades y de esta manera recuperar la salud. Por otro lado existen plantas con efecto antibiótico, con propiedades biocidas, las cuales pueden mejorar su salud pero algunas veces podrían provocar daño indeseable en el organismo.

En muchas oportunidades la población hace uso desmedido de algunas plantas, sin tener conocimiento de su efecto biológico real y sus posibles efectos adversos, mayormente cuando su uso es en forma continua o permanente, provocando así efectos secundarios que en un futuro puedan manifestarse causando problemas irreversibles.

La prueba de *Artemia salina* es usada por ser un método rápido, sencillo y reproducible que nos permite establecer si las plantas poseen efecto tóxico que correlacione con procesos humanos, ya que actualmente son cada vez más injustificables los ensayos en animales para comprobar la efectividad de drogas. Es por eso que en este estudio se experimentó con una forma *in vitro* usando la técnica micrométrica de *A. salina*, la cual nos permite tamizar la actividad tóxica de extractos de plantas.

Dada la sensibilidad de los nauplios a distintas sustancias tóxicas con este bioensayo se puede contribuir a caracterizar una molécula bioactiva en las plantas medicinales validadas, o bien predecir una toxicidad que podría ponernos en alerta para usar este medicamento natural sin correr riesgo de daño a nivel celular.

V. OBJETIVOS

A. General

Contribuir al estudio toxicológico de las plantas nativas de Guatemala que tienen mayor uso terapéutico comprobado.

B. Específicos

1. Estandarizar una técnica micrométrica para evaluar la toxicidad de los extractos de plantas medicinales a nauplios de *A. salina*.
2. Determinar los valores de CL_{50} de 10 extractos activos de plantas de uso medicinal por medio del bioensayo de *A. salina*.

VI. HIPOTESIS

Las plantas de mayor uso terapéutico comprobado, presentan un bajo nivel de toxicidad evaluada por medio del método de *Artemia salina*.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo de trabajo

116 plantas de uso medicinal en Guatemala que tienen un efecto antimicrobiano comprobado.

B. Muestra

Se evaluaron los extractos etanólicos de las 10 plantas más comunmente usadas por su mayor cantidad de propiedades terapéuticas y actividad antimicrobiana, (Anexo1) haciendo uso de la técnica micrométrica de *Artemia salina*.

C. Recursos

1. Humanos

Investigador: Sandra Inés Juárez Garrido

Asesor: Lic. Armando Cáceres

2. Físicos

a) Equipo

Balanza analítica

Potenciómetro

b) Materiales

Agitadores de vidrio

Viales de vidrio

Pipetas ul -ml

Beakers 10-250 ml

Erlenmeyers de 500 ml

Embudos pequeños

Balón de fondo plano 1,000 ml

Molino manual

Frascos de vidrio color ambar

Gradillas

Manguera plástica

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIBLIOTECA CENTRAL

Peceras
Tubos de ensayo
Gradillas
Placas de microtitulación de fondo plano

c) Reactivos

Etanol al 95%
Agua destilada
Agua marina
Extracto de levadura seca

3. Institucionales

Laboratorio Farmaya
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC.

D. Metodología

1. Preparación de extractos

Para la elaboración del extracto vegetales se llevo a cabo el procedimiento consistente en:

- a) Colectar, secar y herborizar cada una de las plantas a estudiar.
- b) Moler una cantidad suficiente de materia seca vegetal.
- c) Preparar un percolador con un balón de 1,000 ml, colocar un disco de papel filtro en el fondo del balón e insertar una manguera plástica con llave de cierre y colocarlo en un soporte de metal específicamente diseñado para este fin.
- d) Pesar 100 g de materia seca y colocar en el balón, agregar 400 ml de etanol al 95% y dejar reposar 24 h.

e) Exprimir la preparación y coleccionar el extracto en un recipiente limpio. Agregar 300 ml de etanol al 95%, agitar con el agitador de vidrio y dejar reposar por 24 h.

f) Exprimir la preparación y coleccionar el extracto en el mismo recipiente, agregar 300 ml de etanol al 95%, agitar y dejar reposar por 24 h.

g) En el caso de hoja muy esponjosas hacer una primera extracción con 600 ml de etanol al 95% y una segunda con 400 ml de etanol al 95% en forma similar.

h) Mezclar el total de extractos y filtrar en papel Whatman No.1 y guardar en un frasco de vidrio color ambar.

i) Concentrar cada uno de los extractos evaporando a sequedad con presión reducida hasta consistencia de miel.

j) Desecar en desecadora con Cloruro de calcio.

2. Toxicidad a *A. salina*. (Microtécnica anexo 3, Macrotécnica anexo 4)

El bioensayo de toxicidad se realizó por medio de:

a) Preparar agua de mar según instrucciones del productor (3.8 g de sal de mar comercial en 100 ml de agua doblemente destilada).

b) Colocar 30 mg de huevos de *A. salina* en un pecera que contenga 100 ml de agua de mar, colocar debajo de luz artificial durante 48h.

c) Transferir la mayor cantidad de nauplios vivos a un recipiente con agua de mar fresca, agregarles extracto de levadura seca (3 mg en 5 ml de agua de mar) y bombearles oxígeno. Continuar burbujeando para formar una suspensión homogénea.

d) Microtécnica (Anexo 3)

Preparación de las muestras: disolver el extracto a ensayar a una concentración de 2 mg/ml.

En una placa de 96 micropozos, de fondo plano colocar:

- 100 ul de nauplios (15-30 nauplios).

- X 100 ul de dilución de extracto, dilución final 1:2 original

Como control negativo 100 ul de agua marina o el disolvente del extracto.

Como control positivo 100 ul del etanol al 95%.

Cada extracto a evaluar se corre en triplicado.

Incubar la placa por 24 h a una temperatura entre 22-29 °C con fuente de luz permanente.

Examinar a las 24 h y hacer el recuento de larvas muertas y vivas. Adicionar 100 ul de MeOH a todo los micropozos, dejar reposar durante 20 min. y contar el total de nauplios.

Si el extracto presenta más del 50% de nauplios muertos, este se evalúa a concentraciones de 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml y 0.12 mg/ml.

Analizar los datos obtenidos con el programa de computadora Finney (DOS) para determinar los valores de CL_{50} . Los valores menores que 1,000 ppm son considerados activos.

E. Diseño experimental

Se realizó un ensayo cuantil para determinar la dosis letal 50 (CL_{50}) enfrentando larvas de *A. salina* a extractos, evaluados en triplicado a una concentración inicial de 2 mg/ml (concentración final de 1000 ppm).

Los extractos que presentaron más del 50% de nauplios muertos a esta concentración fueron evaluados a tres diluciones más: 500 ppm, 250 ppm y 125 ppm. Con un total de tres repeticiones por dilución.

1. Análisis estadístico:

El análisis estadístico que se les hizo a los resultados obtenidos se realizó a través del programa Finney. Este programa realiza la transformación probitica del número de camarones muertos en cada concentración y repetición a valores de CL_{50} . Los valores menores de 1,000 ppm se consideraron activos (3).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GIM.
Biblioteca Central

VIII. RESULTADOS

Para llevar a cabo la evaluación tóxica de las diez plantas medicinales (Anexo 1), se trabajó inicialmente haciendo uso del método macrométrico con *Artemia salina* (Anexo 4), ya que es un método relativamente nuevo en nuestro medio y era necesario familiarizarse con las condiciones de cultivo de los nauplios y los aspectos técnicos del reto anti *A. salina*. Se evaluó el uso de diferentes recipientes de cultivo, así como cantidades de alimento y oxígeno necesarias para una adecuada eclosión y desarrollo.

En vista que el inóculo de nauplios era realizado con tubo capilar, no fue posible su estandarización. El recuento de larvas vivas no era un dato lo suficientemente preciso por la dificultad de hacerlo en tubo de ensayo. Estos aspectos provocaron que el método macrométrico presentara mucha variabilidad en los resultados, lo que indicó que no era confiable, por lo que se concentró el trabajo en la estandarización del método micrométrico con *A. salina*.

Por medio del bioensayo micrométrico fueron evaluados cada uno de los extractos utilizando microplacas de fondo plano de 96 pozos, en las que pudo evaluarse una gran cantidad de extractos utilizando menos material y reactivos. En esta técnica se lograron datos reproducibles. El estandarizar el inóculo en 10 ± 2 nauplios/100 μ l utilizando una micropipeta calibrada y un flujo de oxígeno constante con separación a las 36 h de las larvas nacidas de los huevos sin eclosionar de *A. salina*, permite datos reproducibles y con bajo error experimental.

Se utilizó una dosis inicial de 2 mg/ml y luego se realizaron tres diluciones más. Los nauplios eran obtenidos de una solución homogénea y agregados con pipeta automática. El recuento de larvas vivas y muertas, se hizo por medio de microscopio y por último se agregó metanol, que mata los nauplios, por lo que es útil para confirmar el total de larvas en cada pozo.

Cada uno de los extractos fue evaluado en triplicado a una concentración inicial de 2 mg/ml (concentración final de 1000 ppm). Los extractos que presentaron más del 50% de nauplios muertos a esta concentración fueron evaluados a tres diluciones más: 500 ppm, 250 ppm y 125 ppm, haciendo para cada dilución tres repeticiones.

De los extractos de las diez plantas evaluadas únicamente dos presentaron efecto tóxico sobre el camarón salino: *Solanum americanum* con 0.22 mg/ml (220 ppm) y *Lippia dulcis* con 0.66 mg/ml (660 ppm). El resto de plantas evaluadas no presentaron toxicidad a *A. salina* en valores de 1 mg/ml (1,000 ppm) (Anexo 2).

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

En muchas oportunidades la población hace uso desmedido de algunas plantas, sin tener conocimiento de su efecto biológico real y sus posibles efectos adversos, mayormente cuando su uso es en forma continua o permanente provocando así efectos secundarios que en un futuro puedan manifestarse causando problemas irreversibles. Es por esto que se hace necesario evaluar la toxicidad de los extractos de plantas por medio de técnicas complejas, de mucho tiempo de duración y que muchas veces requieren de equipo sofisticado, reactivos biológicos complejos y de animales de laboratorio.

Un procedimiento de tamizaje para evaluar toxicidad general que no requiere de especialización, es el bioensayo con *A. salina*. Ya que actualmente es cada vez más injustificable los ensayos en animales para comprobar la efectividad de drogas. El bioensayo con *A. salina* nos permite establecer un criterio de selección por medio del cual podemos elegir a las plantas que han presentado indicio de toxicidad para continuar el estudio de toxicidad aguda, subaguda y crónica. En este estudio se experimentó de forma *in vitro* con el bioensayo de *A. salina*, modelo animal fácil de cultivar en condiciones de laboratorio y sensible tanto a sustancia químicas como extractos de plantas.

Con el propósito de familiarizarse con las condiciones de cultivo de *A. salina* y adquirir destreza en los procedimientos de la técnica se realizó el bioensayo macrométrico, el cual es uno de los primeros métodos de tamizaje utilizado en la evaluación de la toxicidad de sustancias químicas o extractos de plantas a larvas de *A. salina*. Los resultados obtenidos revelaron la poca reproducibilidad del método, debido a la dificultad de pescar un inóculo estándar de 10 nauplios, de realizar un recuento exacto de larvas muertas y la dificultad de tamizar grandes series de extractos.

Luego de establecer las condiciones óptimas para el cultivo de los nauplios de *A. salina* se procedió a montar el micrométodo, el cual fue más

fácil estandarizar, por lo que fue utilizado para el estudio toxicológico de los extractos de plantas. Este método nos permitió por prueba y error estandarizar el inóculo de 10 ± 2 nauplios que al ser analizado por el programa Finney nos da una curva probable.

Si bien posee fuentes de error, las concentraciones letales medias son reproducibles. Se ven afectadas por factores como el posible error en la decisión de si están muertas o no, si simplemente están inmóviles o si se están muriendo. Dentro de los factores que puedan afectar la reproducibilidad de la prueba, están: la temperatura, composición y salinidad del medio son factores a los cuales se les debe de poner mucha importancia para poder evitar en lo posible la variabilidad de resultados. Tomando en cuenta que cada uno de los factores mencionados fue controlado, se obtuvo resultados que al ser analizados estadísticamente por el programa Finney mostraron ser reproducibles y concluyentes.

Se evaluaron cada uno de los extractos etanólicos a una concentración de 1mg/ml, las plantas que a esta dosis presentaron una CL_{50} mayor del 50% de nauplios muertos fueron evaluados a tres concentraciones más, 500 ppm, 250 ppm y 125 ppm. El propósito de evaluar el extracto a diferentes concentraciones es poder establecer una curva dosis-respuesta por medio de la cual podamos obtener los valores de la CL_{50} . También se puede afirmar que los resultados son los correctos si el animal sobrevive a una concentración dada deberá sobrevivir a una concentración más baja que ésta; convenientemente el animal que muere con cierta concentración también deberá morir a una concentración mayor que ésta.

El ensayo de tamizaje de *A. salina* nos permitió establecer un parámetro entre las plantas medicinales evaluadas, ya que todas aquellas que poseen valores de 1 mg/ml no son tóxicas de acuerdo a ésta prueba y las que presentan valores menores de 1 mg/ml sí son tóxicas. Los resultados obtenidos aparece en el anexo 2, de las diez plantas evaluadas únicamente dos presentaron valores menores de 1,000 ppm lo que indica

que posee efecto tóxico. Estos hallazgos son importantes ya que podrá existir mayor seguridad al consumir cada una de las ocho plantas que no presentaron efecto tóxico sobre la larva de *A. salina*. Al mismo tiempo deberá continuarse el estudio de las plantas tóxicas que presentan efecto bioactivo sobre la célula y se sospecha que pudieran poseer potencial mutagénico o antimutagénico y en un futuro ser utilizadas para el tratamiento anticancer

Por medio de este ensayo fue posible establecer valores de CL_{50} crónica, ya que el tiempo de exposición de las larvas al extracto fue de 24 h. Mientras que al estar únicamente 6 h en contacto con la planta establece valores de CL_{50} aguda. El significado de esta bioactividad podría interpretarse en dos formas: los nauplios de *A. salina* sufren alguna modificación metabólica que los conduce a la muerte o parálisis, por lo que pudiera ser una técnica para el fraccionamiento bioguiado de moléculas cuya bioactividad correlacione una acción farmacológica. Por otro lado, podrá indicar toxicidad que pudiera correlacionarse con actividad antitumoral o tóxica al humano.

El extracto etanólico de *S. americanum* que posee actividad antibiótica atribuida a α -solamina, un alcaloide esteroideal básico, de peso molecular 559; además por fraccionamiento bioguiado se ha demostrado que el principio responsable de la actividad antifúngica es un glicósido de spirostanol, la catalasaponina 2 (77). Sin embargo el extractos de esta planta mostraron toxicidad a nauplios de *A. salina* lo que es indicativo de cierto grado de toxicidad, estos datos son reforzados con los reportados en la prueba de toxicidad subaguda en dosis de 500 mg (56).

Estudios antimicrobianos informan que la tintura de *L. dulcis* posee actividad antibiótica (41). El extracto etanólico de *L. dulcis* presentó toxicidad a los nauplios de *A. salina*, como también a peces de género *Mollinesia*. El principio edulcorante es la hernandulcina, que no presenta mutagenicidad usando el bioensayo de *S. typhimurium* (65), además no presenta toxicidad aguda en ratón a una sola dosis de 2 mg/kg (78).

X. CONCLUSIONES

1. El bioensayo con *Artemia salina* es un método que permite realizar un tamizaje preliminar de la actividad tóxica, ya que éste es un crustáceo altamente sensible a una gran variedad de sustancias químicas y extractos naturales. La toxicidad se expresa como concentración letal media (CL_{50}) y se acepta como positiva aquella mayor de 1 mg/ml.
2. La macrotécnica resultó ser un método con mucha variabilidad, con procedimiento relativamente engorroso y que por su alta variabilidad no permite un análisis probiótico aceptable.
3. En las condiciones estandarizadas la microtécnica resultó ser un método fácil, reproducible y con una variabilidad mínima, por lo que el análisis probiótico es posible.
4. Los extractos etanólicos de *Solanum americanum* y *Lippia dulcis* son plantas medicinales que poseen efecto tóxico sobre la larva de *Artemia salina*, ya que ambos extractos etanólicos presentaron valores menores de 1000 ppm.

XI. RECOMENDACIONES

1. Establecer el ensayo de microtécnica con *Artemia salina* como una prueba para realizar el tamizaje tóxico preliminar para toda planta medicinal de efecto terapéutico comprobado. Las dosis a usar son 1,000 ppm, 500 ppm, 250 ppm y 125 ppm.
2. Continuar el estudio del efecto biológico real de las plantas medicinales por medio de diferentes métodos que evalúen tanto el potencial tóxico como el mutagénico y citotóxico.
3. Evaluar la toxicidad aguda, subaguda y crónica en modelos animales, de los extractos que demostraron toxicidad a nauplios de *A. salina*.
4. Determinar el mecanismo por medio del cual el extracto vegetal es tóxico a nauplios de *A. salina*.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

XII. REFERENCIAS

1. Bresolin S, and Ferráo V. Mutagenic Potencies of Medicinal Plants Screened in the Ames Test. *Phytotherapy Research* 1993; 7:260-262.
2. Solis P. Ensayo de Artemia salina. Seminario Taller Iberoamericano sobre Nuevos Avances en la Metodología de Screening Anticancer e Informática en Productos Naturales. Panamá 24-28 de Abril de 1995.
3. Steven M and Rusell J. Bioactive Natural Products. Detection, Isolation, and Structural Determinacion. By CRC Press, Inc 1993 pp 441-456.
4. Standley PC, Williams LO. Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany* 1964; 24 (7):281.
5. Robineau L. Towards a Caribbean Pharmacopeia. Santo Domingo. ENDA-Caribe, UNAH. 1989. 474 p.
6. Morton JF. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Springfield, Charles C. Thomas Publisher. 1981. 1420 p.
7. Cáceres A, Samayoa B. Tamizaje de la actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Cuadernos de Investigación No. 6-89. Guatemala, DIGI/USAC. 1989. 138 p.
8. Cáceres A, Samayoa B, Fletes C. Actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de infecciones. Cuadernos de Investigación No. 4-90. Guatemal, DIGI/USAC 100 p.
9. Orellana SL. Indian Medicine in Highland Guatemala Albuquerque, University of New Mexico. Press 1987, 308 p.
10. Nash DL. Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*. 1976; 24 (12):383-384.

11. Guzmán N. Determinación de los componentes mayoritarios del extracto de hojas y flores de *T. lucida* Cav. (Pericón) soluble en eter de Petroleo mediante el uso de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masa (Tesis). Guatemala. Fac CCQQ y Farm, USAC 1987. 40 p.
12. Héthelyi E. GC/MS Analysis of essential oils of some Tagetes species. In: Brunke EJ. Progress in essential oil research. Berlin, Walter de Gruyter. 1986.;131-137.
13. Glasby JS. Dictionary of plants Containing Secondary Metabolites. London. Taylor & Francis. 1991. 314 p.
14. Martínez M. Las plantas Medicinales de México. Botas. México. 1969. 656 p.
15. Rodríguez E. Mabry TJ. Tagetae-Chemical Review. Biol Chem Compos London, Engl. Academic. 1975; 2:785-797.
16. Alcantara MR. Actividad antimicrobiana del género Tagetes (Tesis). Guatemala. Fac CCQQ Farm, USAC 1987. 39 p.
17. Cáceres A. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Screenig of 84 plants against Enterobacteria. J Ethnopharmacol 1990; 30:55-73.
18. Cáceres A. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. Screenig of 68 plants against Gram-positive bacteria. J Ethnopharmacol. 1991; 31:193-208.
19. Cáceres.A. Actividad contra *Vibrio cholerae* de cinco plantas americanas usadas en el tratamiento de infecciones. Memorias. IV Congreso Nacional de Microbiología, Guatemala. 1991. 64 p.

20. Méndez AR. Evaluación de la actividad anti-*Candida albicans in vitro* de diez plantas de uso medicinal en Guatemala. (Tesis). Guatemala Fac CCQQ Farm, USAC 1991. 52 p.
21. Grainge M, Ahmed S. Handbook of plants with Pest-Control Properties. New York, John Willey & Sons. 1988. 2260 p.
22. Ortíz SD. Elucidación del principio activo antiespasmódico en el extracto n-hexano de pericón (*Tagetes lucida* Cav.). Rev Cient Fac CCQQ Farm 1989; 7:9-10.
23. Salguero IE. Estudio Farmacológico de *Tagetes lucida* (Pericón) (Tesis). Guatemala Fac CCQQ Farm, USAC 1989. 86 p.
24. Lara R. Determinación de la actividad inmunomoduladora de los extractos de Zarzaparrilla, quilete y pericón. Memorias. IV Congreso Nacional de Microbiología. 1991. 88 p.
25. Tiwari RD & Singh J. Phytochemistry 1977; 16(7):1107-1108.
26. Tiwari RD & Singh J. Planta Med 1977; 32(4):375-377.
27. Escobar N. Flora Tóxica de Panamá. Universitaria. 1972. 278 p.
28. Cáceres A. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections, 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. J Ethnopharmacol 1991; 31:263-276.
29. Cáceres A. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. J. Ethnophar (accepted for publication) 1992.
30. Jiu J. A survey of some medicinal plants of México for selected biological activities. Lloydia 1966; 29:250-259.

31. FAO Especies forestales productoras de fruta y otros alimentos. 3. ejemplos de América Latina. Roma, FAO. 1987. 241 p.
32. Martínez M. Plantas útiles de la Flora Mexica. Botas. México. 1959. 621 p.
33. Mejía JV. Geografía de la República de Guatemala. Guatemala, Tipografía Nacional. 1927. pp (137-163).
34. Lopez MB. Demostración de la actividad antimicrobiana de *Byrsonima crasifolia* y *Malpighia glabra* (Tesis). Guatemala, Fac CCQQ Farm, USAC. 1992. 66 p.
35. Ministerio de Salud de Nicaragua. Rescate de la Medicina Popular. Estelí, Ministerio de Salud de Nicaragua. 1986. 147 p.
36. Mc Vaugh R. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany 1963; 24(7):392-394.
37. Aguilar Girón JL. Aspectos de la Flora útil de Guatemala. Guatemala, Ministerio de Agricultura. 1966. 383 p.
38. Ayensu ES. Medicinal Plants of the West Indies. Algonac, Reference Publications. 1981. 55 p.
39. Girón LM, Freire V, Alonso A & Cáceres A. Ethnobotanical survey of the medicinal Flora used by the Caribs of Guatemala. J Ethnopharmacol 1991; 34:173-187.
40. Hillis WE, Yakaki Phytochem 1974; 13:495.
41. Cáceres A. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal infeccions. 1: Screening of 38 plant extracts for anticandidal activity. J Etnopharmacol 1991; 33:277-283.

42. Valle AL, Cáceres A. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Activity of *Psidium guajava*, *Spondias purpurea* and *Tagetes lucida* against *Shigella dysenteriae* in an experimental model. Fitoterapia (sent for publication). 1992.
43. Nickell LG. Antimicrobial activity of vascular plants. Econ Bot 1958; 13:281-318.
44. Morales AS. Inhibición *in vitro* de *Trichomonas vaginalis* por extractos acuosos vegetales de uso popular (Tesis). Guatemala, Fac CCQQ Farm, USAC, 1990. 89 p.
45. Ximénez F. Historia Natural del Reino de Guatemala. Guatemala, Ed. José de Pineda Ibarra. 1967. 351 p.
46. Roque JM. Flora Médico Guatemalteca. Guatemala, Tipografía Nacional. 1941. 187 p.
47. Arteché A. Fitoterapia Vademecum de prescripción CITAPE 1992. 835 p.
48. Cáceres A. *et al.* Diuretic activity of plants used for treatment of urinary ailments in Guatemala. J Ethnopharmacol 1987; 19:233-245.
49. Vargas J. *et al.* Síntesis de ácidos nucleicos y miriles de AMP cíclico en tumores murinos después del tratamiento *in vitro* con anapsos. Arch Fac Med Madrid 1981; 40:39-46.
50. Horvath A. *et al.* Metabolic infect calahualin, antitumoral sapopnin of *Polypodium leucotomos*. Nature 1967; 214:125.
51. Vargas J. *et al.* *Polypodium leucotomos* and antipsoriatic drug which increase as the proportion of peripheral blood. Ann Immunol Inst Pateur 1983; 134:393-400.

52. Jiménez D. *et al.* *Polypodium leucotomos* antipsoriatic drug in atopic Dermatitis Allergol Immunopathol 1987; 15:185-189.
53. Padilla HC. *et al.* Hidrofilic fraction of *Polypodium leucotomos* for management of psoriasis. Int J Dermatol 1974; 13:276-282.
54. Arriaza DA. Acción diurética y antimicrobiana de algunos vegetales del género *Smilax* (Tesis) Guatemala, Fac CCQQ Farm, USAC. 1983. 50p.
55. Standley P, Steyermark JA. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany 1952;24(3):92-100.
56. British Herbal Pharmacopoeia London, British Herbal Medical Association.1983.
57. Hobbs C. Sarsaparrilla: A literatura review. Herbal Gram 1988; 17:1-15.
58. Lewis DA. Antiinflammatory Drugs from Plants and Marine Sources. Basel, Birkhauser Verlag. 1989. 373p
59. Berdy J. CRC Handbook of Antibiotic Compound. Boca Raton. CRC Press. Part 1. 1982. 361 p.
60. Gentry JL, Standley PC. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany 1974; 24(10):104-131.
61. Girón LM. Investigación de la inhibición de *C. albicans* por preparaciones de plantas usadas en la medicina popular (Tesis). Guatemala. Fac CCQQ Farm, USAC. 1983. 48 p.
62. Cooney G. Fungicidal activity of a *Solanum* plant extract from Guatemala, C.A. Abstracts. Washington, Pharmacy World Congress, 1991;CS52.
63. Gibson DN. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany. 1970; 24(9):210-211.

64. Villatoro EJ. Recopilación botánica y análisis químico cualitativo de algunas especies de plantas consideradas medicinales de Guatemala.(Tesis). Guatemala Fac CCQQ Farm, USAC. 1979. 63 p.
65. Compadre CM, Rolbins EF & Kinghorn AD. The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: Historical uses, field inquiries, and constituents. J Ethnopharmacol 1986;15:89-106.
66. James D, McChesney and Rober PA. Co-evaluation of Plant Extracts as Petrochemical Substitutes and for Biologically Active Compounds. Economic Botany 1985; 39(1):74-86.
67. Varro ET .Plant Drugs in the Twenty-first Century Economic Botany 1986; 40(3):279-288.
68. Arseculeratne SN, Gunatilaka AA and Panabokke RG. Studies on medicinal plants of Sri Lanka. Part 14: Toxicity of some tradicional Medicinal Herbs. J Ethnopharm 1985; 13:323-325.
69. Shardein JL, Schwetz BA and Kenel MF. Species sensitives and prediction o tetratogenic potencial. Environmental Healt Pespectives 1985; 61:55-67.
70. Meyer BN. *et al.* Brine Shrimp: A Convenient General Biossay for active Plant constituents. J of Medicinal Plant Research Planta Medica 1982; 45:31-34.
71. Solis PN. *et al.* A Micriwel Cytotoxicity Assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp) Planta Med 1993; 59:250-252.
72. Nshimo CM, Pezzuto JM, Kinghorn AD and Farnsworth NR. Cytotoxic Constituents of *Muntingia calabura* leaves and stems Collected in Thailand. Int J Pharmacog 1993; 31(1):77-81.

73. Abascal ME. et al. Estudio de la Citotoxicidad en la células KB de algunas familias de plantas. Estudio citotóxico en plantas. Rev Cub Farm 1986; 20(2):121-125.
74. Anderson JE, Goetz CM and McLaughlin JL. A blind comparison of simple benchtop bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. Phytochemical Analysis. 1991; 2:107-111.
75. Michael A, Thompson CG and Abremivitz M. "*Artemia salina* as a test organism for bioassay"
5. D'Aquino M, Santini P y Moretton J. Estudio comparativo de métodos microbianos para la detección de tóxicos genéticos. Revista Argentina de Microbiología 1979; 11(2): 57-63.
77. He X. et al. J Ethnopharmacol 1994; 43:173-177.
78. Kinghorn A. J Nat Prod 1987; 50:1009.

ANEXOS

Anexo No.1

LISTADO DE PLANTAS MEDICINALES EVALUADAS

| FAMILIA | NOMBRE CIENTIFICO | NOMBRE COMUN | PARTE USADA |
|---------------|------------------------------|---------------|-------------|
| Bixaceae | <i>Bixa orellana</i> | Achiote | (hoja) |
| Compositae | <i>Tagetes lucida</i> | Pericón | (hoja) |
| Leguminosae | <i>Senna occidentalis</i> | Frijolillo | (hoja) |
| Leguminosae | <i>Gliricidia sepium</i> | Madre Cacao | (hoja) |
| Malpighiaceae | <i>Byrsonima crassifolia</i> | Nance | (corteza) |
| Myrtaceae | <i>Psidium guajava</i> | Guayaba | (hoja) |
| Polypodiaceae | <i>Polypodium calahuala</i> | Calahuala | (hoja) |
| Smilacaceae | <i>Smilax lundelii</i> | Zarzaparrilla | (rizoma) |
| Solanaceae | <i>Solanum americanum</i> | Macuy | (hoja) |
| Verbenaceae | <i>Lippia dulcis</i> | Orozús | (hoja) |

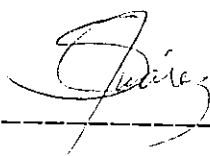
Anexo No 2

**RESULTADOS DE TOXICIDAD DE EXTRACTOS PLANTAS
MEDICINALES CONTRA NAUPLIOS DE ARTEMIA SALINA IN
VITRO**

| NOMBRE CIENTIFICO | TOXICIDAD ^a |
|------------------------------|------------------------|
| <i>Bixa orellana</i> | > 1000 ppm |
| <i>Byrsonima crassifolia</i> | > 1000 ppm |
| <i>Gliricidia sepium</i> | > 1000 ppm |
| <i>Lippia dulcis</i> | 660 ppm |
| <i>Senna occidentalis</i> | > 1000 ppm |
| <i>Smilax lundelii</i> | > 1000 ppm |
| <i>Solanum americanum</i> | 220 ppm |
| <i>Polypodium calahuala</i> | > 1000 ppm |
| <i>Psidium guajava</i> | > 1000 ppm |
| <i>Tagetes lucida</i> | > 1000 ppm |

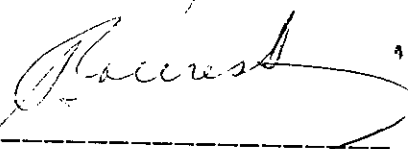
a. Toxicidad a larvas de *Artemia salina*.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central



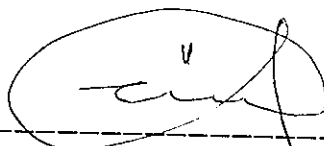
Br. Sandra Juárez

Estudiante



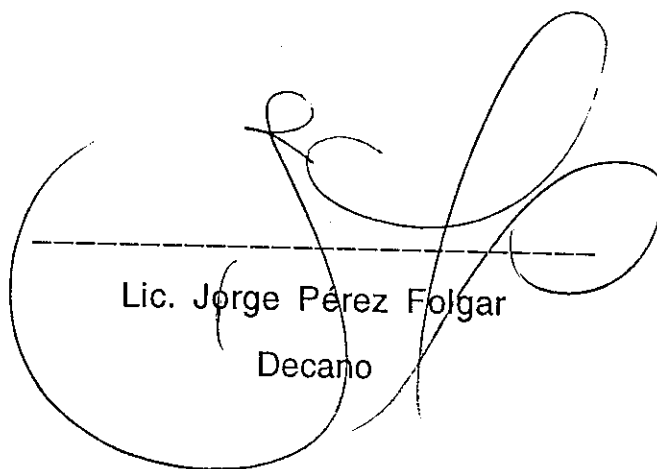
Lic. Armando Cáceres

Asesor



Lic. Gerardo Arroyo

Director de Escuela



Lic. Jorge Pérez Folgar

Decano