Received: 30/06/10 Approved: 30/08/10 Published: 30/09/10

NUEVO MICRO-BIOENSAYO DE ECOTOXICIDAD DE EXTRACTOS ACUOSOS DE PLANTAS MEDICINALES SOBRE *DAPHNIA MAGNA SP.*

Silvia Martínez[1], Alexandra Vela[1], Alejandra Botero[1], Franz Arandia[2], Patricia Mollinedo[1]

[1]Instituto de Investigaciones en Productos Naturales [1]Carrera de Ciencias Químicas [2]Carrera de Ciencias Biológicas Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia Cota – Cota, Campus Universitario, Calle 27

Keywords: Micro Bio-ensayo, ecotoxicidad, plantas medicinales, *Daphnia magna sp.*

ABSTRACT

Toxicity of medical plants used in traditional medical was evaluates by new static microtechnics bioassay. Results show toxic effects of extracts of *Chenopodium quinoa*, *Urtica sp.*, *Achyrocline sp.*, *B. genistiloides y B. latifolia*, household detergent and ethanol on *Daphnia sp.* (invertebrate crustacea), depending on dose and exposure time.

Corresponding author: pattymollinedo@gmail.com

RESUMEN

Se evalúa la toxicidad mediante un nuevo micro-bioensayo estático, de plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional. Se comprobó que existen efectos tóxicos de los diferentes extractos *Chenopodium quinoa*, *Matricaria chamomilla, Urtica sp.*, *Achyrocline sp.*, *B. genistiloides y B. latifolia*, detergente doméstico y el solvente etanol, utilizando *Daphnia sp.* (Crustáceo Invertebrado), la toxicidad se incrementa, dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición.

INTRODUCCION

Debido a malas experiencias con el uso de productos sintéticos tales como DDT, herbicidas, talidomida, varios colorantes carcinogénicos y otros, es que se ha incrementado notablemente, durante los últimos años, el interés en el campo de las "medicinas alternativas" o "medicinas complementarias".[1,2] Según estadísticas (OMS) el 80% de la población en el mundo utiliza la medicina natural.[3] La OMS considera como planta medicinal todo vegetal que contiene, en uno o más de sus órganos, sustancias que pueden ser usadas con finalidades terapéuticas o que son precursores en la Hemisíntesis de productos farmacéuticos.[4,5] Organizaciones como la OMS y otras, recomiendan realizar estudios de todos los productos o nuevas sustancias a los cuales existe exposición humana, para el establecimiento de los criterios de seguridad y efectividad. [6,7] Las investigaciones en microorganismos y en animales son el eslabón más importante en la cadena de evaluaciones toxicológicas de cualquier nuevo compuesto químico antes de ser administrado o utilizado como alimento, fármaco, agroquímico, etc.[8,9] La eficacia de las investigaciones toxicológicas, ha ido en incremento, notablemente en los últimos años, con el desarrollo de los sistemas de pruebas de corto plazo.[10,11,12] Las cantidades a ingerir para que se produzca una intoxicación no es lineal en todas las plantas; en general en una persona adulta podrían bastar gramos, sin embargo, con determinadas plantas bastan miligramos para ser mortal.[13,14,15] También, las intoxicaciones presentan síntomas clínicos que no coinciden con los reportados en la literatura, por lo que se hace difícil el diagnóstico y su tratamiento, por ello, los cuadros clínicos se presentan con extrema complicación y gravedad de los síntomas.[16,17] Considerando que en nuestro medio se continúa utilizando plantas medicinales y el interés por determinar tanto su eficacia como seguridad e inocuidad, se requiere investigar y desarrollar métodos analíticos, ensayos y estudios preclínicos para garantizar la seguridad de los consumidores. Por lo cual el presente trabajo se enfoca en realizar la evaluación eco-toxicológica mediante un nuevo micro-bioensayo estático, de plantas utilizadas en medicina tradicional, para determinar la concentración letal media (CL_{50}) que cause la muerte al 50% de la población experimental *Daphnia sp.*

RESULTADOS, DISCUSION

Received: 30/06/10 Approved: 30/08/10 Published: 30/09/10

Los ensayos se realizaron mediante test estático. Se utilizó SA-*Chenopodium quinoa* como Control positivo y agua desionizada estéril como Control Negativo de Toxicidad, con lo cual como se puede observar en la Figura 1 y en la Tabla 1, la solución de detergente fue la más toxica o nociva para *Daphnia sp.*, con un valor, a las 48 horas de CL_{50} de 0,0005 mg/ml, Etanol CL_{50} de 0,0005 mg/ml y el extracto de *SA-Chenopodium quinoa* tiene una CL_{50} de 0,05 mg/ml a las 96 horas, *Matricaria chamomilla, Urtica sp.*, *Achyrocline sp.*, *B. latifolia* y *B. genistiloides* a 0,05 mg/ml aun no presentan CL_{50} a las 96 horas. Con agua desionizada estéril (control negativo) no se observa ninguna alteración en la motilidad, permaneciendo los neonatos en movimiento. Las saponinas, tienen acción como irritante gastrointestinal, hemolítica, provocando descompensación iónica, manifestándose en parálisis de las células musculares, influye también en la digestión y absorción de distintos componentes de la dieta, razón por la cual se utiliza a *Chenopodium quinoa* como control positivo de toxicidad. Los detergentes presentan características polares y no polares, tienen la capacidad de degradación, vinculada con la disminución de su toxicidad.[18] Los tensoactivos aniónicos (detergente-irritante) tienen CL_{50} de 6,3 mg/l sobre *Daphnia magna*, los tensoactivos no iónicos (detergente-irritante) tienen CL_{50} a las 48h 1-10 mg/l y los tensoactivos anfóteros presentan CL_{50} a las 48h > 1 mg/l., por lo cual se observa que *Daphnia* tiene una alta sensibilidad a los detergentes y también a desinfectantes y mezclas de ellos.[19,20,21,22] Similares resultados se obtienen con la técnica de micro-bioensayo, presentando rápida acción letal y a dosis baja. El etanol se utiliza como solvente para extracciones, por lo cual se realiza su control y datos reportados muestran CL_{50} de Etanol sobre *Daphnia magna* entre 5,680 mg/L y 9,788 mg/L frente a DL_{50} vía oral en rata de 13,700 mg/kg. Comparando los resultados obtenidos, presentan un valor próximo. Los bioindicadores son organismos o sistemas biológicos que sirven para evaluar variaciones en su calidad ambiental, presentan efectos visibles tras ser expuestos a la contaminación. Los ensayos de toxicidad se utilizan para detectar efectos agudos o crónicos de sustancias en organismos representativos, como lo es *Daphnia sp.*, las ventajas que presentan estos microorganismos es el de presentar ciclos de vida cortos, respuesta rápida a cambios en su hábitat. También posee un tamaño apropiado que permite visualizarlo y manipularlo con mayor facilidad. Además permite disponer de abundantes especimenes idénticos en un tiempo relativamente reducido al poseer un corto tiempo generacional (10 a 12 días), condiciones óptimas para su cultivo y manipulación en laboratorio. Con los resultados se observa la alta sensibilidad de *Daphnia sp.* a tóxicos en diversos compuestos, lo que le otorga un criterio de valoración interesante potenciándolo como biosensor de productos naturales.

Tabla 1. *Toxicidad de los extractos en Daphnia sp.*

MUESTRA	CL_{50} mg/mL	CL_{50} mg/mL
	48 Horas	96 Horas
SA-Chenopodium quinoa		0,05
Matricaria chamomilla	-	-
Achyrocline sp.	-	-
Urtica sp	-	-
B. latifolia	-	-
B. genistiloides	-	0,05
ETANOL	0,0005	-
DETERGENTE LIQUIDO OLA	0,0005	

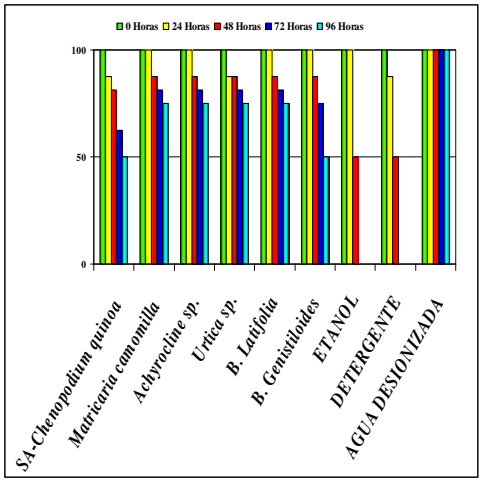

Figura 1. *Respuesta global de los extractos a diferentes tiempos de análisis.*

CONCLUSIONES

El uso de sistemas biológicos para la determinación preliminar de la toxicidad de extractos de fuentes naturales ofrece varias ventajas al reducir el costo, tiempo y espacio requerido para la experimentación, a la vez que nos permite realizar una correlación entre las pruebas toxicológicas en invertebrados y mamíferos, así mismo el micro-

Received: 30/06/10 Approved: 30/08/10 Published: 30/09/10

bioensayo de eco-toxicidad con *Daphnia sp.*, sirve como punto de referencia para realizar ensayos preclínicos de productos naturales que se ofrecen en el comercio (alimentos, productos farmacéuticos, fitofármacos, etc.) y determinar su capacidad tóxica. Los valores obtenidos de CL_{50} se encuentran cercanos a los reportados tal es el caso de los detergentes y los extractos vegetales de consumo general en nuestro país, los que presentan a una toxicidad a largo plazo con el consumo diario y sin alternar ningún otro producto vegetal. Estos hallazgos son muy alentadores y sugieren otros estudios, que conlleven a una posible utilización como un método rápido para el análisis de productos naturales y fármacos en la medicina moderna. Es de trascendencia social la investigación, debido a lo que puede ocasionar el uso y consumo de plantas, siendo incalculable la evaluación en cuanto a su eco-toxicidad puesto que muchas no cuentan con estudios suficientes. La tendencia del mundo actual es regresar a lo natural, por lo cual la importancia de conocer cual es la composición que presenta el producto o material que existe en circulación para ser comercializado, en beneficio de mejorar la calidad de vida. Con la realización de este trabajo se pone de manifiesto que es necesario continuar con los estudios eco-toxicológicos de las plantas.

SECCION EXPERIMENTAL

Metodología

El crustáceo *Daphnia sp.* se utiliza como organismo de prueba para investigar la toxicidad aguda. El medio de incubación utilizado para estos experimentos fue agua reconstituida, pH entre 7,5 y 8,5 y dureza entre 80 y 120 mg $CaCO_3$/L, con una temperatura de 20 ± 2°C, fotoperiodo aproximado de 12 h luz/12 h oscuridad. Para el desarrollo de pruebas de ecotoxicidad aguda con *Daphnia sp.* se emplean neonatos (< 24 h nacidos), expuestos a diferentes concentraciones de los extractos vegetales y se observa si se produce la inmovilidad y posterior muerte del animal de experimentación. Se obtiene la concentración letal media CL_{50} en horas de exposición. Los extractos vegetales se disuelven y diluyen utilizando agua desionizada estéril.

- *Plantas*

Se realizó la extracción acuosa con agua desionizada estéril de *Chenopodium quinoa*, *Urtica sp.*, *Achyrocline sp.*, *Matricaria chamomilla, B. genistiloides y B. latifolia*, concentrando, hasta obtener extracto libre de solvente.

- *Crustaceo Invertebrado*

El crustáceo *Daphnia sp.* [23,24] pertenece al orden cladócero, llamada pulga de agua. Tiene un tamaño que varía entre 0,3 y 1,0 milímetros, habitan en medios acuáticos se alimentan de plancton y de organismos de menor tamaño tales como protistas y bacterias. Se caracterizan por poseer un cuerpo comprimido lateralmente y ovalado; no se distinguen segmentos como en otros crustáceos. Presentan dimorfismo sexual marcado, la hembra es más grande que el macho. Tiene caparazón de quitina transparente, antenas o apéndices con numerosas setas; ojos compuestos y simples (ojo nauplio), una cavidad embriónica con huevos y embriones situados en la parte dorsal, entre el caparazón y el dorso del cuerpo.

REFERENCIAS

[1] Boillot C., et.al., Joint-action Ecotoxicity of Binary Mixtures of Glutaraldehyde and Surfactants Used in Hospitals: Use of the Toxicity Index model and Isoblogram Representation, Ecotoxicology and Environmental Safety, 2008; 71: 252-259
[2] Kumar S., et.al., Herbal Medicine: Current Status and the Futura, Asian Pacific J. Cancer Prev. 2003, 4: 281-288
[3] Estudio del Mercado Regional e Internacional de Plantas Medicinales e Insumos para Fitoterápicos FIDA / UNOPS, Junio, 2006
[4] OMS. WHO Guidelines on Safety Monitoring of Herbal Medicines in Pharmacovigilance Systems. WHO, Octubre 2004
[5] Cañigueral S, et.al., La Fitoterapia como herramienta terapéutica, Ginecología y Obstetricia Clínica, 2005;6(1):43-51
[6] International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria (EHC) Monographs, Nº 6, Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals. Part I. EHC
[7] IPCS International Programme on Chemical Safety Users', Manual for the IPCS Health and Safety Guides, United Nations Environment Programme International Labour Organization, World Health Organization, Geneva 1996, Published by the World Health Organization for the International, Programme on Chemical Safety.
[8] Guilhermino L.,et.al., Acute Toxicity Test with Daphnia magna: An Alternative to Mammals in the Prescreening of Chemical Toxicity?, Ecotoxicology and Environmental Safety, 2000; 46 (3): 357-362
[9] EN ISO 6341, Abril 1996: Water Quality - Determination of the Inhibition of the Mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).
[10] Aoki M. K., et.al., Evaluación toxicológica de productos naturales usando microtécnicas, Rev. Mex. Cs. Farm., 2005; 36 (1): 11-17
[11] Salas F., et.al., Toxicidad aguda y actividad analgésica del extracto acuoso de hojas de *Vismia baccifera* L. var. *dealbata* (Guttiferae) en animales de experimentación, Rev. Facultad de Farmacia, Venezuela, 2007; 49 (1): 5-9

Received: 30/06/10 Approved: 30/08/10 Published: 30/09/10

[12] Norma española. BOE núm. 32, 6 Febrero 2004, Lista de plantas cuya venta al público queda prohibida o restringida por razón de su toxicidad. Ministerio de Sanidad y Consumo

[13] Estrada Ma. A., Tesis: Intoxicaciones por Plantas en Menores de 15 Años, "Hospital Materno Infantil Fernando Velez Paiz", Enero de 2002 a Diciembre de 2003, Facultad de Ciencias Medicas, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN. Managua-Nicaragua

[14] Hall R. V., Rocha P. M., Rodriguez V. E., Plantas Medicinales Volumen II, Serie de Actualización Profesional, Centro Nacional de Información de Medicamentos CIMED, Mayo, 2002. Editor Universidad de Costa Rica.

[15] Gutierrez H., et. al., Análisis comparativo de la toxicidad del extracto acuoso en cocimiento de la harina de maca *(Lepidium meyenii, Walp)* en tres especies de animales modelos: Artemia franciscana *(Crustácea, Anostraca)*, pez Guppy *(Poecilia Reticulata)* y ratón *(Mus musculus)*, Rev. Horizonte Médico, 2007; 7 (2):103-108

[16] Iannacone J., et..al., Efectos tóxicos de cuatro plantas amazónicas sobre *Chironomus calligraphus* Goeldi 1905 (Diptera: Chironomidae) y *Artemia franciscana* Kellog 1906 (Anostraca: Artemiidae), Rev. Bras. Toxicol. 2008; 21(1): 25 – 32

[17] Iannacone J, et.al., Efecto toxicológico del "Sachayaco", *Paullinia clavigera* (Sapindaceae) sobre *Daphnia magna* y sobre dos controladores biológicos de plagas agrícolas. J. Braz. Soc. Ecotoxicol. 2007; 2:15-25

[18] Sandbacka M., et.al., The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and Fish-A Comparative Study, Toxicology in Vitro, 14 (2000), 61-68

[19] Cserháti T., Forgács E., Oros G., Biological activity and environmental impact of anionic surfactants, Environment International, 2002; 28: 337- 348

[20] Iannacone J., et. al., Efecto del Detergente doméstico Alquil Aril Sulfonato de Sodio lineal (LAS) sobre la Mortalidad de tres Caracoles Dulceacuícolas en el Perú , Ecología Aplicada, 2002, 1(1)

[21] Lewis M. A., Suprenant D., Comparative acute toxicities of surfactants to Aquatic Invertebrates, Ecotoxicol. Environ. Saf. 1983; 7: 313-322

[22] Sobrino-Figueroa A. S., et.al., Degradación y Toxicidad de 5 Formulaciones de Detergentes Comerciales, UAMI, México D.F. México, 1er Congreso de la Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental A.C., del 22 al 26 de marzo del 2004, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Jiutepec, Morelos, Mexico.

[23] OECD Series on Testing and Assessment No.211. *Daphnia magna* Reproduction Test, 1998

[24] Moiseenko T. I., Aquatic Ecotoxicology: Theoretical Principles and Practical Application, Water Resources, 2008, 35 (5): 530–541