

Evaluación de la toxicidad aguda por el procedimiento de dosis fijas de un extracto de *Boldoa purpurascens* Cav. (Evaluation of the acute toxicity of the method fixed dose procedure of an extract of *Boldoa purpurascens* Cav.)

Pérez Machín, Maykel: Vicerrectorado de Investigaciones. Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara | **Monteagudo Jiménez, Emilio E:** Unidad de Toxicología Experimental. (UTEX) Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara | **Bofill Cárdenas, María de los Ángeles:** Unidad de Toxicología Experimental. (UTEX) Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara | Dulce María González Mosquera: Departamento de Farmacia. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas | **Méndez Triana, Rayza:** Vicerrectorado de Investigaciones. Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara | **Verdecía Machado, Belkys:** Unidad de Toxicología Experimental. (UTEX) Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara.

Email: mayelpm@iscm.vcl.sld.cu

REDVET: 2008, Vol. IX, Nº 3

Recibido: 21.11.07 / Revisado: 27.01.08 / Referencia: 030822_REDVET / Aceptado: 27.02.08 / Publicado: 01.03.08
Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030308.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030308/030822.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.
Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET®
- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Resumen

Se realizó un estudio experimental con el objetivo de evaluar el posible efecto tóxico de un extracto acuoso liofilizado de *Boldoa purpurascens* Cav. (nitro blanco). Para el desarrollo del mismo se utilizó el Procedimiento de Dosis Fijas (FDP), utilizando una dosis límite de 2000 mg/kg de peso corporal. Los animales seleccionados fueron ratas de la línea Sprague Dawley, con un peso comprendido entre 150 y 200 g. Los resultados demostraron la inocuidad de la planta al no observarse signos ni síntomas de toxicidad. El peso corporal se comportó acorde a la curva de crecimiento de la especie y no se apreciaron alteraciones macroscópicas en los órganos estudiados, todo lo que permite afirmar que la DL50 se ubica por encima de 2000 mg/kg PC, considerándose el producto como No Clasificado (no tóxico).

Palabras claves: toxicidad aguda | FDP | métodos alternativos | plantas medicinales.

Summary

An experimental study to assess the toxic effects of an aqueous and later lyophilised extract of *Boldoa purpurascens* Cav. (nitro blanco) was carried out. It was employed the alternative Fixed Dose Procedure. There were used Sprague Dawley rats weighing between 150 and 200 g, which received a limit dose of 2000 mg/kg body weight and were kept under standardized experimental conditions. Results showed neither signs nor symptoms of toxicity. Bodyweight

Evaluación de la toxicidad aguda por el procedimiento de dosis fijas de un extracto de *Boldoa purpurascens* Cav

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030308/030822.pdf>

behaved consistent with the growing curve of this species and there were no alterations in macroscopic observations on main organs. The LD50 of this extract is located above 2000 mg/kg body weight, considering it as Non Classified (non toxic).

Key words: acute toxicity | FDP | alternatives testing | medicinal plants.

Introducción

El uso de fitomedicamentos constituye una nueva categoría terapéutica que sin dudas revolucionó el esquema de tratamiento medicinal de fines del siglo XX y marca un aporte ascendente en el siglo XXI. La existencia de plantas con un elevado potencial terapéutico constituye una alternativa farmacológica de marcado interés en el tratamiento de muchas enfermedades, de ahí la importancia de realizar estudios preclínicos con el propósito de detectar posibles efectos tóxicos post administración.

La validación científica de las plantas medicinales es una necesidad, no podemos limitar a la sabiduría popular la seguridad y eficacia de una planta, pues cada parte de ella tiene numerosas sustancias con actividad biológica, capaces potencialmente de producir efectos tóxicos¹. La introducción de estas en la terapéutica debe efectuarse sobre una base científica que valide tanto sus acciones farmacológicas como su toxicidad.²

Existe una ruta crítica establecida para la evaluación y desarrollo de productos farmacéuticos conformada por una serie de fases de carácter obligatorio, que incluyen evaluaciones farmacológicas y toxicológicas experimentales.

La caracterización farmacológica de un producto a nivel preclínico no está completa si no se ha examinado exhaustivamente sus posibles reacciones tóxicas. La población pudiera detectar aquellas que posean frecuencias altas de aparición, pero las que se manifiestan de manera tardía podrían pasar inadvertidas a un observador bien entrenado.^{1, 2}

Dentro de la batería de ensayos de primera barrera se encuentran los estudios de toxicidad a dosis única imprescindibles en la estimación del potencial tóxico de una sustancia, referido como el estudio cuali-cuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas.³

La aplicación de los métodos alternativos en el campo de la toxicología es reciente y coincide con la oposición social al uso indiscriminado de animales de experimentación, así como la necesidad que tenía esta ciencia de dar un paso de avance en la evaluación del riesgo de toxicidad. Corrientes Regulatorias Medioambientales han considerado por razones éticas y económicas el uso racional y humano de los animales de experimentación, contribuyendo a la adopción internacional de criterios regulatorios en la validación y análisis de métodos alternativos científicamente seguros, menos costosos, rápidos y extrapolables que favorezcan la implantación de las 3R propuestas por Russell y Burch(1959) referidas a Reducir (disminución), Refinar (perfeccionamiento) y Reemplazar (sustitución) el uso animal, unido a una 4R de Responsabilidad por parte de los investigadores.⁴

El procedimiento de dosis fijas o FDP por sus siglas en inglés aparece recogido en la guía No. 420 de la OECD como alternativa a la prueba clásica aguda. El mismo se basa en la evaluación de dosis prefijadas (5, 50, 300 y 2000 mg/kg) para discernir la clasificación tóxica de una sustancia según el Sistema Global Armonizado⁵. La dosis seleccionada debe ser no letal, no dolorosa y no estresante, además de no ser corrosiva ni severamente irritante.

La *Boldoa purpurascens* Cav. comúnmente conocida como nitro blanco, es una planta silvestre utilizada de forma tradicional por la población cubana. Se le considera un poderoso diurético,

útil en las enfermedades de las vías urinarias, siendo tan eficaz como el mastuerzo y comparable a la sal de nitro, a lo cual probablemente debe su nombre.⁶ Se reportan usos tradicionales de la planta empleando una dosificación de dos o tres hojas hervidas en agua durante 5 minutos suficientes para obtener una taza de cocimiento, el cual puede tomarse varias veces al día

Objetivo

Evaluar experimentalmente la toxicidad aguda de la *Boldoa purpurascens* Cav mediante el procedimiento de dosis fijas.

Materiales y métodos

Método de evaluación

La toxicidad aguda a dosis única se evaluó mediante el método alternativo Procedimiento de Dosis Fijas (FDP), internacionalmente validado y aceptado.⁷

Sustancia de ensayo

Extracto acuoso liofilizado de *Boldoa purpurascens* Cav. El liofilizado fue elaborado en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Para su obtención se utilizó un reactor con capacidad para 20 l con agitación. El extracto se preparó al 10% utilizando 2 kg de la droga. Posteriormente se procedió a la filtración del mismo utilizando primeramente un filtro de membrana gruesa y después uno de membrana fina. Una vez terminado el proceso de filtrado se concentró el extracto hasta obtener una concentración de sólidos totales de 10 mg/ml. Una vez elaborado el extracto se sometió a un proceso de liofilización empleando una liofilizadora Edward modelo L-40 (Reino Unido) pasando por las tres etapas que rigen este ciclo (congelación, sellado primario, secado secundario).

Modelo biológico

Ratas Sprague Dawley identificadas convenientemente en la oreja, con una masa corporal de 200 ± 30 g y edad de $7,5 \pm 0,5$ semanas. Los animales se mantuvieron en salas climatizadas a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con una humedad relativa entre 30 y 70% y ciclos luz/oscuridad de 12/12 horas. Recibieron como alimento dieta comercial pelletizada EMO (Alyco®, CENPALAB) con su correspondiente certificado de calidad. El agua era de calidad apta para consumo humano. El acceso a los alimentos y al agua fue ad libitum. Los animales fueron sometidos a cuarentena e inspección clínica diaria durante 5 días antes del inicio de experimento.

Diseño experimental

Aleatoriamente se conformó el grupo experimental constituido por cinco ratas machos. La sustancia de ensayo fue administrada con un ayuno previo de 16 a 18 horas por vía oral mediante cánula intragástrica 16G, a dosis única de 2000 mg/kg de masa corporal, teniendo en cuenta la ausencia de signos o síntomas de toxicidad por esta vía de administración y los datos toxicológicos de las sustancias de ensayo. Se dosificaron los 5 animales diariamente a una concentración de 2 g/10ml para garantizar su estabilidad. Se administró una dosis diaria por vía oral de 2000 mg/kg de peso corporal.

Los animales fueron observados individualmente durante los primeros 30 minutos, con especial atención durante las primeras 4 horas y diariamente hasta los 14 días del experimento, recogiendo signos y síntomas de toxicidad

Las observaciones estuvieron dirigidas a la determinación de: Muerte y tiempo de ocurrencia de la misma, signos y síntomas de toxicidad incluyendo su comienzo y duración, además de cambios en la piel, membranas de mucosas y ojos, en el sistema respiratorio, en el circulatorio, en el nervioso central y en el autónomo, en la actividad somatomotora y en la

Evaluación de la toxicidad aguda por el procedimiento de dosis fijas de un extracto de *Boldoa purpurascens* Cav

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030308/030822.pdf>

conducta. Se prestó especial atención a la potencial ocurrencia de tremor, convulsiones, salivación, diarrea, letargo y somnolencia.

Se controló el peso vivo de los animales en los días 1, 7 y 14 del experimento como uno de los parámetros demostrativos de toxicidad. Al concluir el experimento se sacrificaron los animales por inhalación de éter etílico para el posterior estudio anatomopatológico macroscópico del cerebro, el estómago, el hígado, el bazo, los pulmones, los riñones, los músculos, el esófago y el intestino delgado.

Resultados y discusión

La administración de una dosis límite de 2000 mg/kg de masa corporal no provocó muerte de los animales o síntomas indicativos de toxicidad. Siempre se registró una conducta normal en los animales, con reflejo postural normal, hábitos de aseo y respuesta habitual a los estímulos nociceptivos, así como consumo de alimentos y agua como corresponde a su especie.^{8,9}

La masa corporal como indicador de toxicidad, se comportó dentro de los parámetros establecidos para la curva de crecimiento de la especie y línea del modelo biológico utilizado (Tablas 1 y 2). Los estudios anatomopatológicos macroscópicos no mostraron ninguna alteración en los órganos estudiados ni se observaron alteraciones clínicas.

Tabla 1. Relación de la media de pesos corporales y su variación por grupos experimentales

| Animales | Peso corporal (g) | | | |
|-----------------|-------------------|-------|--------|------------|
| | Día 1 | Día 7 | Día 14 | ΔP |
| 1 | 195 | 202 | 209 | 14 |
| 2 | 195 | 204 | 210 | 15 |
| 3 | 205 | 229 | 246 | 41 |
| 4 | 215 | 228 | 238 | 23 |
| 5 | 205 | 226 | 245 | 40 |
| Promedio | 203 | 217.8 | 229.6 | 26.6 |

Tabla 2. Rango de peso corporal con relación a la edad en semanas de la especie y línea de estudio

| Edad (semanas) | Peso corporal (g) |
|----------------|-------------------|
| 7-8 | 180-200 |
| 8-9 | 200-220 |
| 9-10 | 220-240 |

Actualmente se acepta desde el punto de vista regulatorio que no es necesario definir un valor puntual de DL50 para una sustancia y que resulta prácticamente suficiente ubicar dicha dosis en un rango.¹⁰ Las regulaciones para la ejecución de este tipo de estudio alternativo de toxicidad aguda plantean que si no existen informes anteriores de toxicidad de la sustancia que se investiga es posible utilizar una dosis límite de 2000 mg/kg de masa corporal, lo que se ajusta a nuestro estudio dado que de la sustancia en estudio no se ha señalado toxicidad en su extenso uso tradicional.

La planta objeto de estudio ha sido profundamente estudiada por el Departamento de Farmacia de la Universidad Central de las Villas. Se han realizado varios estudios químico-analíticos, uno de ellos logra la caracterización de una fracción de sales identificada como un sólido blanquecino con un 15,7% de rendimiento y una composición de potasio de 0,9%.¹¹ y finalmente obtienen un sólido de color carmelita con un rendimiento de 0,41% correspondiente a un crudo de flavonoides. Se refiere además la extracción de saponinas a partir de la droga cruda y el extracto liofilizado.¹¹

La presencia de flavonoides en el extracto acuoso fue corroborada por técnicas cromatográficas mostrando un comportamiento similar al reportado en la literatura para este tipo de metabolito.¹² Durante la caracterización espectroscópica en el infra rojo (IR) se pudo comprobar la existencia de bandas características de grupos OH, enlaces C_{SP3}-H y señales de bandas a 1385 cm⁻¹ y 1075 cm⁻¹ lo cual sugieren la presencia de saponinas triterpénicas.¹²

Se ha planteado de forma preliminar la presencia de taninos, como posibles metabolitos responsables de la acción del nitro blanco.^{12,13} Por otra parte se ha inferido la poderosa acción diurética al elevado contenido de sales potásicas presentes en la planta, pues la literatura refiere gran cantidad de plantas diuréticas cuyos metabolitos responsables son las sales potásicas.^{14,15,16}

Se han determinado los índices numéricos de cenizas totales, cenizas insolubles en HCl, agua y la humedad residual. Los valores elevados de cenizas obtenidos demuestran el elevado porcentaje de componentes inorgánicos presentes en la planta.^{16,18} Durante la caracterización físico-química del extracto acuoso al 10% se determinaron algunas propiedades organolépticas como: pH, densidad relativa, análisis capilar, índice de refracción y sólidos totales. Se identificaron además la presencia de metales pesados como: Potasio, plomo, cadmio, hierro, cobre, cromo, magnesio y calcio, con los valores de absorbancia correspondientes a sus concentraciones; confirmándose la sospecha que existía sobre la presencia de gran cantidad de K⁺ presente en las hojas de la *Boldoa purpurascens* (0,9%). El sodio, magnesio y el calcio se hallaron también en cantidades importantes, demostrándose de esta forma el elevado contenido de sales iónicas presentes en la planta.¹⁶

Conclusiones

En las condiciones del ensayo no se produjo mortalidad ni se manifestaron síntomas indicativos de toxicidad en los animales estudiados. El peso corporal como indicador de toxicidad se comportó en ascenso y estuvo dentro de los parámetros establecidos para la curva de crecimiento de la especie y línea de estudio. Los estudios anatomopatológicos macroscópicos no mostraron ninguna alteración en los órganos estudiados. La DL50 del extracto se encontró por encima de 2000 mg/kg de masa corporal, calificándose según el Sistema Global Armonizado, como "No clasificado" ("No tóxico").

Recomendaciones

El estudio de la toxicidad a dosis única se encuentra dentro de la batería de ensayos de primera barrera imprescindibles en la estimación del potencial tóxico de una sustancia. Se recomienda completar la caracterización toxicológica de este producto ejecutando los ensayos a dosis repetida (subagudos, subcrónicos y crónicos) y de toxicología especial.

Bibliografía

1. Morón FJ. Plantas medicinales y medicamentos herbarios. En: Morón FJ, Levy M. Farmacología general. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2002. p. 195-205.
2. Morón, F, Villán J, Martínez M.J. Rev. Cubana Med. Gen. 1991; 7: 276-84.
3. Dipascuale L, Wallace H. Acute toxicity and eye irritancy. In: Principles and methods of toxicology. 4thed. Philadelphia: Taylor and Francis; 2001.
4. Validation of Alternative Methods (ICCVAM): a review of the ICCVAM test method evaluation process and current international collaborations with the European Centre for

- the Validation of Alternative Methods (ECVAM). *Altern Lab Anim*, 2002 Dec; 30 Suppl 2: 23-32.
5. OECD. Guideline 420 Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure [sitio Web en Internet]. Francia: Guideline for Testing of Chemicals, Inc.; 2007 [actualizado 26 Jun 2007; citado 14 Ene 2007]. Disponible en: <http://www.oecd.org>
 6. Roig JT. Nitro. En: *Plantas medicinales y aromáticas o venenosas de Cuba*. La Habana: Científico-Técnica; 1998. p. 675-6.
 7. OECD. Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental. [sitio Web en Internet]. Francia: Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Inc.; 2007 [actualizado 21 Jun 2007; citado 10 Jun 2007]. Disponible en:
8. <http://www.oecd.org/ehs/class/HCL6.htm>
 9. Consejo Canadiense de Protección de Animales. Manual sobre el cuidado y uso los animales de experimentación vol.I. 2^{da} ed. Ottawa: Consejo Canadiense de Protección de los Animales; 1998.
 10. Alemán C, Rodeiro MR, Hernández M. Ensayo de toxicidad a dosis repetidas durante 28 días del extracto acuoso de *Cecropia peltata* L. (yagruma) en ratas Cnp:SPRD. *Lab Animals*. 32: 457-66.
 11. Kennedy GL, Ferenz RL, Burgess BA. Estimation of acute oral toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than the LD50. *J Appl. Toxicol*, 1986; 2001; 6: 145-8.
 12. González DM, Valentín D, Martínez M, Sausedo Y. Evaluación de la actividad diurética de una fracción aislada del extracto acuoso de *Boldoa purpurascens* Cav [CD-ROM]. Santa Clara: Centro Provincial de Información de Ciencias Médicas; 2005.
 13. González DM, Cuéllar A, Milián L. Estudio fitoquímico del extracto acuoso de *Boldoa purpurascens* Cav. *Rev Cubana Farm*. 2001; Supl Esp: 172-3.
 14. Hernández Y, Mollineda M, González DM. Estudio de la actividad hemolítica de los posibles taninos extraídos a partir de *Boldoa purpurascens* Cav. *REDVET* [serie en Internet]. 2006 Oct [citado 21 Jun 2007]; 7(10): [aprox. 5 p.]. Disponible en:
15. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101006.html>
 16. Rodríguez M. Fitoterapia en afecciones versas en medicina interna. En: *Introducción a la fitoterapia*. México DF: Herbal; 2001. p. 107-14.
 17. Arteché A, Vanaclocha B, Guenechea JL, editores. *Fitoterapia. Vademécum de prescripción de plantas medicinales*. 4^{ta} ed. Barcelona: Masson; 2003. Plantas diuréticas; p. 207-18.
 18. Jiménez L, León MC, Herrera R, García G, Cárdenas JL. Efecto diurético de *Xanthium strumarium* L. (guizazo de caballo). *Rev Cubana Plant Med* [serie en Internet]. 1999 Ene [citado 21 Jun 2007]; 4(1): 2004: [aprox. 5 p.]. Disponible en:
19. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47961999000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es

REDVET® [Revista Electrónica de Veterinaria](http://www.veterinaria.org) (ISSN nº 1695-7504) es medio oficial de comunicación científico, técnico y profesional de la Comunidad Virtual Veterinaria, se edita en Internet ininterrumpidamente desde 1996. Es una revista científica veterinaria referenciada, arbitrada, online, mensual y con acceso a los artículos íntegros. Publica trabajos científicos, de investigación, de revisión, tesinas, tesis doctorales, casos clínicos, artículos divulgativos, de opinión, técnicos u otros de cualquier especialidad en el campo de las **Ciencias Veterinarias** o relacionadas a nivel internacional.

Se puede acceder vía web a través del portal [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org). <http://www.veterinaria.org> o en desde **RECJET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> Se dispone de la posibilidad de recibir el Sumario de cada número por correo electrónico solicitándolo a redvet@veterinaria.org

Si deseas postular tu artículo para ser publicado en **REDVET®** contacta con redvet@veterinaria.org después de leer las Normas de Publicación en <http://www.veterinaria.org/normas.html>

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica siempre que se cite la fuente, enlace con [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org). <http://www.veterinaria.org> y **REDVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Veterinaria Organización S.L.® (Copyright) 1996-2008 E_mail: info@veterinaria.org