

ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA DE PLANTAS MEDICINALES ARGENTINAS MEDIANTE EL BIOENSAYO DE *ARTEMIA SALINA* LEACH.

ELENA R. MONGELLI* JORGE D. COUSSIO** Y GRACIELA N. CICCIA*

*Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología.

** Cátedra de Farmacognosia, IQUIMEFA (CONICET).

Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Junín 956 (1113) Buenos Aires, República Argentina.

Resumen:

Se efectuó el screening de los extractos acuosos de 19 plantas medicinales argentinas mediante el empleo del bioensayo de citotoxicidad de *Artemia salina* con el objeto de estudiar su toxicidad aguda.

La concentración de 10000 µg de extracto/ml de solución resultó ser el límite superior de concentración sensible para discernir entre extractos acuosos tóxicos y no tóxicos para este crustáceo.

STUDY ON THE ACUTE TOXICITY OF ARGENTINE MEDICINAL PLANTS USING THE *ARTEMIA SALINA* LEACH. BIOASSAY

Summary:

Screening of the aqueous extracts of 19 Argentine medicinal plants has been carried out using the *Artemia salina* cytotoxicity bioassay in order to study their acute toxicity. The concentration of 10000 µg of extract/ml of solution demonstrated to be the upper concentration limit sensitive to distinguish toxic and non toxic aqueous extracts to this crustacean.

Introducción

Aproximadamente 950 especies vegetales de la flora argentina figuran en la literatura

Palabras claves: Toxicidad aguda, *Artemia salina*, citotoxicidad, plantas medicinales argentinas, bioensayo.

Key words: Acute toxicity, *Artemia salina*, cytotoxicity, Argentine medicinal plants, bioassay.

por sus propiedades medicinales o tóxicas⁽¹⁻¹⁷⁾. Entre estas, la mayoría ha sido usada empíricamente por pobladores rurales e indígenas, principalmente bajo la forma de infusiones o decocciones. Debido al creciente interés del mundo occidental por los productos naturales actualmente los habitantes de las ciudades también emplean muchas de las plantas de la medicina folclórica como medicamentos herbarios.

El presente trabajo tiene por objeto el estudio de toxicidad aguda de extractos acuosos de plantas medicinales argentinas mediante el uso del ensayo de citotoxicidad de *Artemia salina* en microplaca. Este método fue elegido debido a que es relativamente rápido, económico, reproducible, y utiliza un gran número de organismos que permiten una buena evaluación estadística⁽¹⁸⁾. Además, la modificación en microplaca propuesta por Solís y colaboradores⁽¹⁹⁾ permite la disminución de la cantidad de material analizado y el procesamiento de un mayor número de muestras y diluciones en menos tiempo que el método original en viales⁽²⁰⁾. Este bioensayo ha sido ampliamente usado en screenings fitoquímicos para detectar bioactividad general y guiar el fraccionamiento⁽²¹⁻²⁴⁾, como primer paso para detectar actividad antitumoral y pesticida⁽²⁵⁻²⁸⁾ y para predecir toxicidad aguda de extractos vegetales y compuestos puros en humanos^(29,30).

Materiales y métodos

Material vegetal

Se recolectaron las plantas en sus hábitats naturales en la República Argentina. La identificación taxonómica fue llevada a cabo por botánicos del Museo de Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, donde se depositaron muestras del material recolectado.

Preparación del extracto acuoso

El extracto acuoso fue preparado de la siguiente manera: Se preparó una infusión con 100 ml de agua hirviendo y 5 g de material vegetal seco y pulverizado. Se mantuvo la mezcla en reposo durante 20 minutos. Posteriormente la preparación fue filtrada y se obtuvo el extracto acuoso por liofilización.

Preparación de las muestras

Se disolvieron 10 mg de extracto en 5 ml de agua de mar artificial. Se preparó el agua de mar artificial disolviendo 3,8 g de sal marina («Marinemix», Wiegandt, Alemania) en 100 ml de agua destilada (Solución A). 100 µl y 1000 µl de esta solución se diluyeron 10 veces con agua de mar artificial (soluciones B y C).

Ensayo de citotoxicidad de *Artemia salina* en microplaca

Todas las soluciones de los extractos se testearon a niveles de concentración de

100, 1000 y 10000 µg/ml, dispensando 100 µl, por sextuplicado, en una microplaca de 96 pocillos («Kartell», Milán, Italia). Los huevos de *Artemia* («S y S», Buenos Aires, Argentina) se adquirieron en un comercio especializado en veterinaria y se incubaron en agua de mar artificial a temperatura ambiente. Luego de 48 hs. se recolectaron los nauplios. Se agregaron 100 µl de una suspensión que contenían de 10 a 15 nauplios a cada pocillo de la microplaca, la que se tapó e incubó a temperatura ambiente por 24hs. Luego de este período se contaron los nauplios muertos en cada pocillo utilizando un microscopio binocular («E. Lentz Wetzlar», 10X). Finalmente, se agregaron 100 µl de metanol a cada pocillo, y, luego de 30 minutos se contó el número total de nauplios. Se empleó berberina («Sigma», St. Louis, USA) como control positivo. Para calcular la concentración de extracto que mata al 50 % de los nauplios en 24 horas (LC50) y el intervalo de confianza del 95%, se utilizó el método estadístico probit descripto por Finney⁽³¹⁾.

Resultados

Dado que las especies vegetales en estudio (Tabla 1) se usan en la medicina popular principalmente como infusiones, en el presente trabajo se analizó la citotoxicidad de los correspondientes extractos acuosos. Se empleó para ello el bioensayo de *Artemia salina* (Ver Materiales y métodos), utilizando como parámetro de toxicidad la concentración letal 50 (LC50) menor o igual a 1000 µg/ml, propuesta por el método original tanto para los extractos acuosos como orgánicos⁽²⁰⁾. En estas condiciones de ensayo ninguno de los extractos testeados resultó tóxico. En este sentido, Abertenethy y col.⁽³²⁾ encontraron una correlación positiva entre la solubilidad en agua de varios compuestos y la toxicidad aguda hacia los crustáceos *Artemia salina* Leach. y *Daphnia magna* Strauss.: a mayor solubilidad en agua, mayor LC50 y, por lo tanto, menor toxicidad. Así, estos autores concluyen que la toxicidad aguda de muchos compuestos químicos hacia los crustáceos es influida primariamente por la forma en que se particionan las sustancias entre el agua y el organismo. En otras palabras, los compuestos extraídos por un solvente orgánico poseen mayor probabilidad de ser tóxicos que los extraídos por el agua. De esta forma, con el límite de citotoxicidad fijado como LC50 <1000 µg/ml para todo tipo de extracto, los extractos acuosos tienen, frente a los orgánicos, muy baja posibilidad de ser detectados como tóxicos.

Basándonos en estos resultados, y con el objeto de discriminar entre extractos acuosos citotóxicos y no citotóxicos se modificaron las condiciones experimentales aumentando en un orden de magnitud la concentración máxima a analizar. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2. Como puede observarse, 8 de los 19 extractos ensayados resultaron tóxicos para la *Artemia*: *Aristolochia triangularis*, *Terminalia triflora*, *Achyrocline flaccida*, *Baccharis coridifolia*, *B. grisebachii*, *Phyllanthus sellowianus*, *Satureja parvifolia* y *Balbisia calycina*.

Estos resultados coinciden con la toxicidad informada para *Aristolochia triangularis* y *Baccharis coridifolia*⁽³³⁾. Con respecto a la primera, es interesante señalar que contiene ácido aristolóquico, que es uno de los más potentes carcinógenos conocidos⁽³⁴⁾. Además, las especies del género *Aristolochia* integran una lista de hierbas que no se pueden

importar en Australia para uso terapéutico⁽³⁵⁾. Asimismo, cabe consignar que la *Baccharis coridifolia* se encuentra descripta dentro de las especies tóxicas para el ganado en Sudamérica⁽³⁶⁾.

De acuerdo con estos hallazgos, se considera más apropiado 10000 µg/ml como límite de concentración superior para el screening de extractos acuosos con el fin de detectar toxicidad aguda.

Dado que *Achyrocline flaccida*, *Phyllanthus sellowianus*, *Satureja parvifolia* y *Balbisia calycina*, son especies vegetales actualmente comercializadas en el mercado argentino como medicamentos herbarios, sería interesante encarar un estudio más exhaustivo sobre la toxicidad aguda y crónica de estas plantas en modelos animales.

Conclusiones

El límite de 1000 µg/ml para discernir entre extractos activos y no activos en el ensayo de *Artemia salina* propuesto por Meyer y col.⁽²⁰⁾ para todo tipo de extracto vegetal, no resultó satisfactorio para el screening primario de citotoxicidad de extractos acuosos. Si se tiene en cuenta que este bioensayo es útil para predecir toxicidad aguda de extractos vegetales y compuestos puros en humanos^(29,30), se considera que 10000 µg/ml sería el límite máximo de concentración sensible para diferenciar extractos acuosos tóxicos y no tóxicos.

Bibliografía

1. Parodi, D. (1881). **Ensayo de Botánica Médica Comparada**. Tesis doctoral. Facultad Nacional de Ciencias Medicas, Imprenta Pablo Coni, Buenos Aires: 16-103.
2. Hieronymus, J. (1882). **Plantae diaphoricae florum argentinarum**. Boletín de la Academia Nacional de Ciencias en Córdoba, Tomo IV, Buenos Aires: 207-531.
3. Rojas Acosta, N. (1905). **Plantas medicinales del Chaco Austral**. Imprenta Gadola, Buenos Aires: 3-31.
4. Domínguez, J.A. (1928). **Contribuciones a la Materia Médica Argentina**. Trabajos del Instituto de Botánica y Farmacología 44, Talleres SA Casa Jacobo Peuser, Buenos Aires: 80-413.
5. Bandoni, A. L. y col. (1972). Survey of Argentine medicinal plants: Folklore and phytochemical screening. **J. of Nat. Prod.** 35: 69-80.
6. Amorín, J.L. (1980). Guía taxonómica con plantas de interés farmacéutico (primera parte). **Revista de Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología** 3: 7-25.
7. Amorín, J.L. (1980). Guía taxonómica con plantas de interés farmacéutico (segunda parte) **Revista de Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología** 3: 95-112.

8. Ratera, E.L. y Ratera, M. O. (1980). **Plantas de la flora Argentina empleadas en Medicina Popular**. Hemisferio Sur, Buenos Aires: 57-190.
9. Toursarkissian, M. (1980). **Plantas medicinales de la Argentina: sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica**. Hemisferio Sur, Buenos Aires: 1-178.
10. Martínez Crovetto, R. (1981). **Plantas utilizadas en Medicina en el Noroeste de Corrientes**. Ministerio de Cultura de la Nación, Tucumán: 13-125.
11. Vuoto, P.M. (1981). Plantas útiles de los toba-taksek. **Entregas del Instituto Tilcara** (Tilcara, Jujuy, Argentina) 1: 12-76.
12. Amorín, J. L. y Rossow, Ricardo A. (1989). Guía taxonómica con plantas de interés farmacéutico (primera parte) **Dominguezia** 1: 31-40.
13. Amorín, J. L. y Rossow, Ricardo A. (1990). Guía taxonómica con plantas de interés farmacéutico (segunda parte) **Dominguezia** 1: 28-33.
14. Amorín, J. L. y Rossow, Ricardo A. (1991). Guía taxonómica con plantas de interés farmacéutico (tercera parte) **Dominguezia** 1: 54-63.
15. Amorín, J. L. y Rossow, Ricardo A. (1992). Guía taxonómica con plantas de interés farmacéutico (cuarta parte) **Dominguezia** 1: 35-40.
16. Ibarlegui, L. y Hurrell, J. (1992). Asteraceae de interés etnobotánico de los Departamentos de Santa Victoria e Iruya (Salta, Argentina). **Ecognición** 3: 3-18.
17. Base de datos del IQUIMEFA (CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires.
18. Mc Laughlin, J. L., Chang, Ch-J. y Smith, D. L. (1991). **Studies in natural products chemistry**, vol. 9, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 383-409.
19. Solís, P. N. y col. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). **Planta Medica** 59: 250-252.
20. Meyer, B.N. y col. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plants constituents. **Planta Medica** 45: 31-34.
21. Del Rayo Camacho y col. (1991). Pinocembrine: a bioactive flavonone from *Teloxys graveolens*. **J. of Ethnopharmacol.** 31, 383-389.
22. Fatope, M.O., Ibrahim, H. y Takeda Y. (1993). Screening of higher plants reputed as pesticides using Brine shrimp Lethality Assay. **In. J. of Pharmacognosy** 31: 250-254.
23. González, A. y col. (1993). Biological screening of Uruguayan medicinal plants. **J. of Ethnopharmacol.** 39: 217-220.
24. Mousa, O. y col. (1994). Bioactivity of certain Egyptian Ficus species. **J. of Ethnopharmacol.** 41: 71-76.
25. Mikolajczak, K. L., Mc Laughlin, J. L. y Rupprecht, J. K. (1988). U.S. Patent No. 4, 721, 728; Enero 26.
26. Mikolajczak, K. L., Mc Laughlin, J. L. y Rupprecht, J. K. (1989). U.S. Patent No. 4, 855, 319; Agosto 8.
27. Mc Laughlin, J. L. (1992). **Methods in Plant Biochemistry**, vol. 6, Academic Press, New York, 1-32.
28. Mc Laughlin, J. L. y Hui, Y-H. (1993). U.S. Patent No 5, 229, 419; Julio 20.

29. Calleja, M.C. y Persoone, G. (1992). Cyst-based toxicity test IV. The potential of ecotoxicological test for the prediction of acute toxicity in man as evaluated on the first ten chemicals of the MEIC programme. **ATLA** 20: 396-405.
30. Noamesi, B. K. y col. (1994). Antiulcerative properties and acute toxicity of some African medicinal plants extracts. **J. of Ethnopharmacol.** 42: 13-18.
31. Finney, D. (1971). **Probit Analysis**. Cambridge University Press, Cambridge.
32. Abernethy, S. y col. (1986). Acute lethal toxicity of hydrocarbons and chlorinated hydrocarbons to two planktonic crustaceans: the key role of organism-water partitioning. **Aquatic Toxicol.** 8: 163-174.
33. Ragonese, A.E. y Milano, V. A. (1984). Vegetales y sustancias tóxicas de la Argentina. **Encicl. Argent. Agric. Jard.** 2(8-2): 92-97; 317-322.
34. De Smet, P. A.G.M. (1992). **Adverse effects of herbal drugs**. Springer-Verlag, Berlin vol 1: 84-85.
35. Anonymous. (1988). Guidelines for importers of therapeutic substances into Australia. Dept. of Community, Services and Health, Canberra.
36. Gallo, G.G. (1979). **Plantas tóxicas para el ganado en el Cono Sur de América**. EUDEBA, Buenos Aires: 103-108.
37. Parker, J. (1949). **Mil plantas medicinales**. Biblioteca nueva, Buenos Aires: 170.
38. Boelcke, O. (1992). **Plantas vasculares de la Argentina. Nativas y exóticas**. Hemisferio Sur, Buenos Aires: 208.
39. Zardini, E. M. (1984). Etnobotánica de Compuestas argentinas con especial referencia a su uso farmacológico. **Acta Farmacéutica Bonaerense** 3: 77-99.
40. Giberti, G. (1983). Herbal folk medicine in Northwestern Argentine (Compositae) **J. of Ethnopharmacol.** 7: 321-341.
41. Burgstaller, J. (1984). **700 Hierbas Medicinales**. Librería Hachette, Buenos Aires: 130.
42. Soraru, S. B. y Bandoni, A. L. (1978). **Plantas de la Medicina Popular Argentina**. Albatros, Buenos Aires: 53.
43. Alonso Paz, E., Bassagoda, M. J. y Ferreira, F. (1992). **Yuyos. Uso racional de las plantas medicinales**. Fin de Siglo, Montevideo: 92.
44. Moreno Azorero, R. 1975. **Obstetricia y Ginecología Latinoamericana**, set-oct: 17.

Tabla 1. Datos etnobotánicos de las plantas estudiadas.

Familia, nombre botánico	Nombre vulgar	Parte usada*	Uso popular	Ref.
ARISTOLOCHIACEAE <i>Aristolochia triangularis</i> Cham. et Schlecth.	Mil hombres.	C.	Antiséptica. Antirreumática. Emenagoga. Antídoto. Abortiva.	8, 9, 37,38.
COMBRETACEAE <i>Terminalia triflora</i> (Griseb.) Lillo.	Lanza amarilla.	H.	Tintórea.	38.
COMPOSITAE <i>Achyrocline flaccida</i> (Weinm.) DC.	Marcela hembra.	PA.	Antiespasmódica. Tónica. Antihelmíntica. Febrífuga.	5.
<i>Ambrosia tenuifolia</i> Spr.	Altamisa, ajeno del campo.	PA.	Antitusiva. Abortiva. Anticoncep. Antirreumática. Antineurálgica.	39.
<i>Baccharis coridifolia</i> DC.	Romerillo, mío-mío.	PA.	Antiinflamatoria uso externo. Tratamiento de las bicheras de los caballos. En sahumerio, quemada junto con azufre, para tratar el moquillo de los caballos.	5,10, 39.
<i>Baccharis grisebachii</i> Hieron.	Quinchamal, lancha.	PA.	Tratamiento de heridas. Antirreumática.	39,40.
<i>Eupatorium arnottianum</i> Griseb.	Clavel, uoué.	PA.	Antespasmódica.	16.
<i>Eupatorium buniifolium</i> H. et A.	Romero, romerillo colorado, romerillo.	PA.	Antiséptica. Hepatoprotectora.	3,41.
<i>Eupatorium candolleanum</i> H. et A.	Iyagaelta'a, tabaco del monte.	PA.	Purgante.	11.
<i>Eupatorium christieanum</i> Bak.	Hoja de la Virgen.	PA.	Tratamiento de enferm. renales.	39.
<i>Eupatorium hecatanthum</i> (DC.) Bak.	Uoué.	PA.	Analgesica. Antitusiva. Antiespasmódica.	11.
<i>Eupatorium laevigatum</i> Lam.	Doctorcito. Caá-hú.	PA.	Emenagoga. Tintórea.	39.
<i>Eupatorium macrocephalum</i> Less.	Illa ka'ik.	PA.	Antitusiva. Digestiva. Abortiva.	39.
<i>Gamochaeta simplicicaulis</i> Cabr.	Plan-kachú.	PA.	Contra la viruela, el sarampión y la varicela. Uso externo: lavado de granos y llagas.	5.
EUPHORBIACEAE <i>Phyllanthus sellowianus</i> Mueller Arg.	Sarandí blanco, sará- morotí.	C.	Antidiabética. Purgante. Diurética. Antiséptica. Antihipertensiva.	42,43.
LABIATAE <i>Satureja parvifolia</i> (Phil.) Epl.	Muña-muña.	PE.	Afrodisíaca. Digestiva.Emenagoga. Tratamiento del apunamiento.	2, 9.
<i>Satureja odora</i> (Griseb.) Epl.	Muña-muña	H.	Digestiva.	9.
LEDOCARPACEAE <i>Balbisia calycina</i> (Gris.) AT.Hunziker et Ariza.	Té andino.	PA.	Carminativa. Digestiva. Antiácida.	41.
POLYPODIACEAE <i>Campyloneuron phyllitidis</i> (L.) Presl.	Calagualla.	H.	Abortiva.Reguladora de la fertilidad	44.

* Parte usada: C, corteza; H, hojas; PA, parte aérea; PE, planta entera.

Tabla 2. LC50 e intervalo de confianza del 95 % ($\mu\text{g/ml}$) de los extractos acuosos testados a 10000, 1000 y 100 $\mu\text{g/ml}$.

Planta (Familia, nombre botánico)	LC50 e intervalo de confianza del 95 % ($\mu\text{g/ml}$)
ARISTOLOCHIACEAE <i>Aristolochia triangularis</i>	3309 (3901-2713)
COMBRETACEAE <i>Terminalia triflora</i>	6094 (7232-5323)
COMPOSITAE <i>Achyrocline flaccida</i>	4917 (5905-4045)
<i>Ambrosia tenuifolia</i>	>10000
<i>Baccharis coridifolia</i>	4173 (4830-3394)
<i>Baccharis grisebachii</i>	2288 (2938-1627)
<i>Eupatorium amottianum</i>	>10000
<i>Eupatorium buniifolium</i>	>10000
<i>Eupatorium candolleanum</i>	>10000
<i>Eupatorium christieanum</i>	>10000
<i>Eupatorium hecathantum</i>	>10000
<i>Eupatorium laevigatum</i>	>10000
<i>Eupatorium macrocephalum</i>	>10000
<i>Gamochaeta simplicicaulis</i>	>10000
EUPHORBIACEAE <i>Phyllanthus sellowianus</i>	3490 (4160-2641)
LABIATAE <i>Satureja parvifolia</i>	3235 (3712-2764)
<i>Satureja odora</i>	>10000
LEDOCARPACEAE <i>Balbisia calycina</i>	8002 (13119-5987)
POLYPODIACEAE <i>Campyloneuron phyllitidis</i>	>10000