

## Evaluación de la Toxicidad Aguda de un Extracto de *Boldoa purpurascens* Cav. por el Método de las Clases

Maykel PÉREZ <sup>1\*</sup>, Emilo E. JIMENEZ <sup>2</sup>, María BOFFILL <sup>2</sup>, Dulce M. GONZÁLEZ <sup>3</sup>,  
Belkys VERDECÍA <sup>2</sup> & Freisman BLANCO <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Vicerrectorado de Investigaciones. Universidad Médica de Villa Clara  
Carretera a Acueducto y Circunvalación, Santa Clara, Cuba

<sup>2</sup> Unidad de Toxicología Experimental. Universidad Médica de Villa Clara, Cuba

<sup>3</sup> Departamento de Farmacia. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, Cuba

**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 Método de las Clases de Toxicidad Aguda (CTA), 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 180 y 220 g. 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 categoría 5.

**SUMMARY.** "Acute Toxicity Evaluation of an Extract of *Boldoa purpurascens* Cav." An experimental study to assess the toxic effects of an aqueous and later lyophilised extract of *Boldoa purpurascens* Cav. (nitro blanco) was carried out employing the alternative Acute Toxicity Class Method. Sprague Dawley rats weighing between 180 and 220 g were used, which received a limit dose of 2000 mg/kg body weight and were kept under standardized experimental conditions. Bodyweight behaved consistently with the growing curve of the species and there were no alterations in macroscopic observations on main organs. The LD50 of the extract is located above 2000 mg/kg body weight, classifying the product in category 5.

### INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales constituyen una valiosa alternativa terapéutica y su validación científica 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 tóxicos <sup>1</sup>. La introducción de estas en la terapéutica debe efectuarse sobre una base científica que valide tanto sus acciones farmacológicas como su toxicidad <sup>2</sup>.

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 <sup>3,4</sup>.

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 <sup>1,2</sup>.

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 h <sup>5</sup>.

La aplicación de los métodos alternativos en

**PALABRAS CLAVES:** *Boldoa purpurascens* Cav., Ratas, Toxicidad aguda oral.

**KEY WORDS:** Acute toxicity, *Boldoa purpurascens* Cav., rats

\* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: maykeleperez2003@yahoo.es, maykelpm@iscm.vcl.sld.cu

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 & 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 <sup>6</sup>.

El método de Clasificación Toxicológica Aguda (CTA) o método de las Clases, fue adoptado originalmente en 1996 en la Guía N° 423 de la OECD e internacionalmente validado usando para ello 20 sustancias en un estudio colaborativo donde participaron 9 laboratorios de 10 países <sup>7</sup>. Con su introducción ha surgido una nueva variante para la estimación de la toxicidad de una sustancia por vía oral, que tiene como objetivo describir la clase de toxicidad sin precisar un valor exacto de la DL50.

La *Boldoa purpurascens* Cav. (= *Boldoa ovatifolia* Lag.), conocida comúnmente como nitro blanco, pertenece a la familia de las Nyctagináceas. Es una hierba de un metro o poco más de altura, con tallo erecto, ramoso y las ramas delgadas, angulosas, lampiñas. Hojas alternas, pecioladas, anchamente ovales, agudas, enteras, con base subtruncada y decurrente en el pecíolo; lampiñas de color verde claro; flores verdosas, pequeñas, sésiles, conglomerado racemosas. El cáliz es fructífero, pubescente, cuadridentado en el ápice. Presenta 4 estambres, con hipoginos libres, anteras biloculares, dídimas. Los ovarios son ovoideos, sésiles. Los estilos son simples, adelgazándose insensiblemente hasta terminar en el estigma aleznado, agudo. Aquenio comprimido, apeciado. Embrión subanular, endospermo carnosofarináceo <sup>8</sup>.

Esta planta silvestre habita en terrenos de serpentina de los alrededores de Guanabacoa, cerca de la costa en Marianao, Jaimanita y se puede encontrar en zonas del litoral norte de Corralillo, así como en lugares húmedos en terrenos del municipio de Sagua la Grande, provincia de Villa Clara, Cuba; meridianos (81 y 80°), paralelo(23°). Sus partes más empleadas

con fines terapéuticos son las hojas y renuevos consideradas un poderoso diurético, útil en 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. Se reportan usos tradicionales de la planta empleando una dosificación de dos o tres hojas hervidas en agua durante 5 min, suficientes para obtener una taza de cocimiento, el cual puede tomarse varias veces al día <sup>8</sup>.

Se han identificado de forma cualitativa por técnicas de tamizaje fotoquímico los metabolitos presentes en la planta, resultando positivos los ensayos de FeCl<sub>3</sub>, Shinoda y ensayo de espumas, indicando la presencia de taninos, varios tipos de flavonoides y saponinas fundamentalmente. En un tamizaje realizado a tres extractos de planta se logra definir la siguiente composición química de sus hojas: extracto etéreo (ácidos grasos, triterpenos y/o esteroides), extracto alcohólico (saponinas, triterpenos y/o esteroides, taninos y/o fenoles, flavonoides, aminoácidos), extracto acuoso (azúcares reductores, taninos y/o fenoles, flavonoides, saponinas) <sup>9</sup>.

Se han realizado varios estudios químico-analíticos a la planta, 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% 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. La presencia de flavonoides fue corroborada por técnicas cromatográficas mostrando un comportamiento similar al reportado en la literatura para la presencia de este tipo de metabolitos. Durante la caracterización espectroscópica en el infra rojo (IR) se pudo comprobar la existencia de bandas características de grupos OH, enlaces CSP3-H y señales de bandas a 1385 cm<sup>-1</sup> y 1075 cm<sup>-1</sup>, lo cual sugieren la presencia de saponinas triterpénicas.

Se ha planteado de forma preliminar la presencia de taninos como posibles metabolitos responsables de la acción del nitro blanco <sup>10</sup>. 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 <sup>11</sup>.

Tomando en consideración el uso tradicional de esta planta y el interés farmacológico de desarrollar un fitomedicamento a partir de ella, se

hace necesario evaluar su potencial tóxico a través del método de las Clases de Toxicidad (CTA), para determinar los signos y síntomas derivados de la exposición a dosis única de un extracto acuoso liofilizado procedente de la planta, en ratas y evaluar los daños asociados a su administración.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó la toxicidad aguda a dosis única mediante el método de Clasificación Toxicológica Aguda (CTA) del extracto acuoso liofilizado de *Boldoa purpurascens* Cav. (nitro blanco). El mismo fue elaborado en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Para su obtención a gran escala se utilizó un reactor con capacidad para 20 L con agitación, donde la temperatura de la camiseta fue de 120 °C. El extracto se preparó al 10% utilizando 2 Kg de la droga (hojas de planta) y agua destilada como solvente. Posteriormente se procedió a la filtración utilizando un filtro de membrana gruesa y después uno de membrana fina. Una vez concluido el proceso de filtrado se concentró el extracto hasta obtener una concentración de sólidos totales de 10 mg/mL.

Posteriormente a la elaboración del extracto se sometió a un proceso de liofilización empleando una liofilizadora Edward modelo L-40 (Reino Unido), y la solución se congeló a una temperatura máxima de -40 °C. La temperatura del condensador fue de -50 °C, el tiempo de enfriamiento de 4 h y el calentamiento a las platinas a 20 °C. Las condiciones de liofilización cumplieron las 3 etapas que rigen este ciclo (congelación, sellado primario y secado secundario).

El estudio de evolución de la toxicidad aguda se realizó en la Unidad de Toxicología Experimental perteneciente al Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara. Para el experimento se utilizaron ratas de la línea Sprague Dawley procedentes del Centro Nacional de Animales de Laboratorio (CENPALAB), saludables y de ambos sexos, con un peso entre 180 y 220 g. Los animales se marcaron con un panchador de oreja, se mantuvieron en cuarentena 5 días previos al comienzo del experimento para inspección diaria de su estado general. Para la conformación de ambos grupos experimentales 24 h antes de iniciar la administración, los animales fueron pesados y distribuidos (3 animales por cada sexo).

El producto de ensayo se reconstituyó con agua destilada inmediatamente antes de ser ad-

ministrado, a una dosis diaria por vía oral de 2000 mg/Kg de peso corporal de acuerdo con la metodología establecida por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD) # 423<sup>7</sup>. Cada animal recibió una dosis única de 2 g/kg peso corporal, vía oral mediante cánula intragástrica 16 G con un ayuno previo de 16 a 18 h. Se utilizó solamente una dosis límite teniendo en cuenta la ausencia de reportes de toxicidad por esta vía de administración, los datos toxicológicos del producto en estudio y a criterio de los investigadores. Se dosificaron 3 hembras y 3 machos a razón de 2 mL por cada 100 g de peso corporal, comenzando el primer día por las hembras. El pesaje de los animales se realizó los días 1, 7 y 14 con el objetivo de detectar posibles variaciones del peso corporal durante la etapa experimental. Las observaciones después de la administración se establecieron de la siguiente manera: el primer día 4 observaciones cada 6 h, el segundo día 2 observaciones cada 12 h y a partir del tercer día y hasta el día 14 una observación cada 24 h. Al concluir los días de observación se practicó la eutanasia de los animales mediante anestesia con éter dietílico respetando la ética del sacrificio y se realizó el análisis anatomopatológico macroscópico con muestreo de sistema digestivo, corazón, hígado, bazo, riñones y pulmones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la administración de la dosis de 2000 mg/kg, no existieron anomalías clínicas. 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<sup>12-14</sup>. No se observó ningún signo de toxicidad evidente ni muerte de los animales de experimentación.

El peso corporal como indicador de toxicidad se comportó dentro de los parámetros establecidos para la curva de crecimiento de la especie y de la línea de investigación<sup>12</sup>. En la Tabla 1, Fig.1 se muestra el comportamiento de los pesos corporales de las ratas hembras, en ambos se observa una ganancia de peso por encima de los 23 g. De igual manera se produce un incremento de peso en las ratas machos por encima de los 59 g (Tabla 2, Fig. 2).

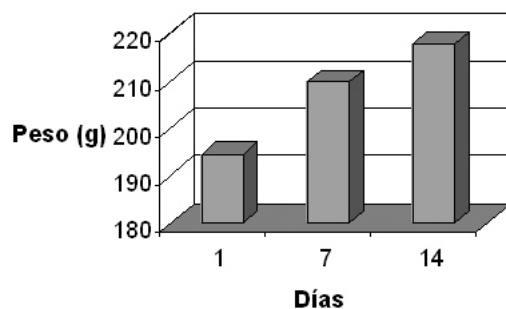
Al aplicar la prueba de Friedman para comparar los pesos entre ambos sexos se pudo constatar que sólo existen diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) a los 14 días en relación al peso. Aunque al 7º día no se apreciaron

| Animales | Peso corporal (g) |        |        |            |
|----------|-------------------|--------|--------|------------|
|          | Día 1             | Día 7  | Día 14 | $\Delta P$ |
| 1        | 198               | 220    | 225    | 27         |
| 2        | 198               | 213    | 225    | 27         |
| 3        | 188               | 197    | 205    | 17         |
| Promedio | 194,66            | 210,00 | 218,00 | 23,66      |

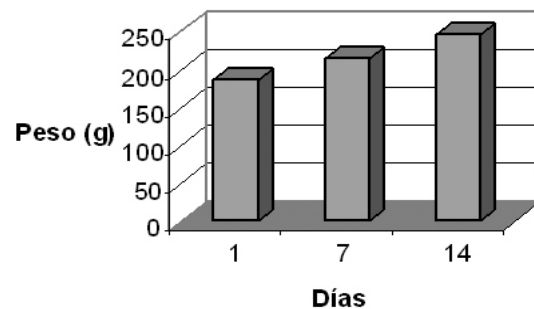
**Tabla 1.** Relación de la media de pesos corporales y su variación en ratas hembras.

| Animales | Peso corporal (g) |        |        |            |
|----------|-------------------|--------|--------|------------|
|          | Día 1             | Día 7  | Día 14 | $\Delta P$ |
| 1        | 187               | 218    | 254    | 67         |
| 2        | 187               | 215    | 244    | 57         |
| 3        | 185               | 211    | 240    | 55         |
| Promedio | 186,33            | 214,66 | 246,00 | 59,66      |

**Tabla 2.** Relación de la media de pesos corporales y su variación en ratas machos.



**Figura 1.** Ganancia de peso por días en ratas hembras.



**Figura 2.** Ganancia de peso por días en ratas machos.

diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ), sí se observó una tendencia al incremento del mismo. Comparando posteriormente los pesos promedios en ambos sexos al inicio, 7 y 14 días mediante la prueba t de Student se observó que solamente a los 14 días existían diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que la DL50 se ubica por encima de 2 g/kg. Actualmente se acepta desde el punto de vista regulatorio que no es necesario definir un valor puntual de DL50 para una sustancia; que resulta prácticamente suficiente ubicar dicha dosis en un rango <sup>7,12</sup>. Las regulaciones para la ejecución de este tipo de estudio alternativo de toxicidad aguda plantean que si no existen reportes anteriores de toxicidad de la sustancia que se investiga es posible utilizar una dosis límite de 2 g/kg.

No se produjo mortalidad ni síntomas atribuibles a toxicidad y los estudios anatomopato-

lógicos macroscópicos no mostraron alteración alguna. El análisis de signos clínicos manifestó buen estado general de los animales y apariencia normal, caracterizada por pelos brillantes, ojos claros y brillantes, mucosas normocoloreadas. Los signos vitales fueron normales, no existiendo alteraciones en las frecuencias cardíacas y respiratorias. En cuanto al análisis de la conducta se determinó un comportamiento normal exploratorio. La respuesta a los estímulos fue normal y estuvo caracterizada por una uniformidad en la movilidad del total de los animales ante el toque y fuera de sus jaulas.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la DL50 se ubicó por encima de 200 mg/kg, el extracto acuoso liofilizado de *Boldoa purpurascens* Cav. no provocó mortalidad en las dosis ensayada y no se encontraron alteraciones morfológicas relacionadas con toxicidad, clasificándose el producto como Categoría 5.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Morón, FJ. (2002) *“Plantas medicinales y medicamentos herbarios”*, Ed. Ciencias Médicas, La Habana, págs 195-205.
2. Morón, F., S.P. Villán J. & M.J Martínez (1991) *Rev. Cubana Med. Gen.* **7**: 276-84.
3. Pérez, M., M. Cid & R. Méndez (2007) *J. Biomed.* Disponible en: <<http://biomed.uninet.edu/2007/n1/perez.html>>
4. CECMED (1998) *Rev Cubana Plant Med.* **3**: 83-8.
5. Dipascuale L, H. Wallace (2001) “Principles and methods of toxicology” Ed. Reviews, Philadelphia, págs 853-917.
6. Stokes, W.S., L.M. Schechtman & R.N. Hill (2002) *Altern Lab Anim.* **30**: 23-32.
7. OECD (2000). Guide N° 423. Disponible en: <[URL:http://www.oecd.org](http://www.oecd.org)>.
8. Roig, J.T. (1998) *“Plantas medicinales y aromáticas o venenosas de Cuba”*, Ed. Científico-Técnica, La Habana, págs. 675-6.
9. González, D., A. Cuéllar & M. Cid (2001) *Rev. Cub. Farm.* Supl Especial 174-6.
10. Hernández, Y, M. Mollineda & D. González (2006) *REDVET*. Disponible en: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101006.html>>
11. Rodríguez, M. (2001) *“Introducción a la fitoterapia”*. Ed. Herbal, México, págs 107-14.
12. Consejo Canadiense de Protección de Animales (1998) *“Manual sobre el cuidado y uso los animales de experimentación”*. Ottawa. Disponible en: <[http://www.ccac.ca/en/CCAC\\_Programs/Guidelines\\_Policies/GUIDES/SPANISH/V1\\_93/CHAP/CH1.HTM](http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/SPANISH/V1_93/CHAP/CH1.HTM)>
13. Alemán, C., M.R. Rodeiro & M. Hernández (1998) *Lab Animals.* **32**: 457-66.
14. Schelde, E., M.V. Diener & W. Kayser (1985) *Arch Toxicol.* **85**: 659-70.