

Estudio toxicológico del extracto total y fracciones cromatográficas de las hojas de *Clibadium asperum* en animales de experimentación, Iquitos, 2009

Toxicological study of the total extract and chromatographic fractions of *Clibadium asperum* leaves in experimental animals, Iquitos, 2009

Nonato-Ramírez L. D.¹, Nina-Chora E. A.² y Villacrés-Vallejo J. Y.^{2,3}

Recibido: octubre 2010

Aceptado: diciembre 2010

RESUMEN

Fue objeto del estudio, determinar la toxicidad de extractos de hojas de *Clibadium asperum* (Aubl) (DC) (Asteraceae) en ratones albinos. Las hojas fueron recolectadas en el caserío de Lamas-Tiphisca, Intuto (río Tigre), departamento de Loreto. Se prepararon extractos metanólicos y acuoso, posteriormente se liofilizaron. El extracto acuoso liofilizado (EAL), presentó alcaloides, azúcares reductores, saponinas, flavonoides; en la fracción metanólica (FM) se identificaron esteroides, glicósidos cardiotónicos, derivados terpénicos, esteroides, antronas, cumarinas, antraquinonas. Mediante el método de Clases Tóxicas Agudas (CTA), la DL₅₀ oral en ratones machos estuvo entre 400 y 670 mgkg⁻¹; en ratones hembras entre 410 y 620 mgkg⁻¹. Con la dosis de 2000 y 1000 mgkg⁻¹, se manifestaron signos de naturaleza convulsivante, dificultad en la respiración, incremento de la función colinérgica y muerte. Con la dosis de 500 mgkg⁻¹, se observó disminución de la actividad motora, curiosidad, acicaleo, incapacidad para controlar y coordinar movimientos. La administración por vía oral de 10 mgkg⁻¹/día/30 días, manifestó incremento de leucocitos, fosfatasa alcalina, linfocitosis, monocitosis, disminución de hematocrito, hemoglobina, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH), cambios en la permeabilidad de K⁺ y Ca²⁺ y nivel de creatinina normal. Con la dosis de 50 mgkg⁻¹, se observó actividad analgésica y retardo en la propulsión intestinal. Se concluye que EAL y FM presentan efectos tóxicos.

Palabras claves: toxicidad aguda, metabolitos secundarios, Asteraceae, *Clibadium asperum*.

ABSTRACT

The object of the study was to determine the toxicity of leaf extracts of *Clibadium asperum* (Aubl) (DC) (Asteraceae) in albino mice, collected in the village of Lamas, Tiphisca, Intuto (Tigre River), in the Loreto Region. Methanol and aqueous extracts were prepared, later they were lyophilized. The lyophilized aqueous extract (EAL) had alkaloids, reduced sugars, saponins and flavonoids; in the methanol fraction (MF) it were identified sterols, cardiac glycosides, terpenics derivatives, steroids, anthrones, coumarins and anthraquinones. By acute toxic class method (CTA), the oral LD₅₀ in male mice is between 400 and 670 mgkg⁻¹, in female mice between 410 and 620 mgkg⁻¹. Doses of 2000 and 1000 mgkg⁻¹, showed signs of convulsive nature, difficulty in breathing, increased cholinergic function and death. In doses of 500 mgkg⁻¹, there were decreased motor activity, curiosity, acicaleo, and inability to control and coordinate movements. The oral administration of 10 mgkg⁻¹/day/30 days, showed increased leukocyte, alkaline phosphatase, lymphocytosis, monocytosis, decreased hematocrit, haemoglobin, MCV, MCH and MCHC, changes in the permeability of K⁺ and Ca²⁺ and a normal level of creatinine. With a doses of 50 mgkg⁻¹, it was observed analgesic activity and delayed intestinal propulsion. We conclude that EAL and MF have toxic effects.

Key words: acute toxicity, secondary metabolites, Asteraceae, *Clibadium asperum*.

¹ Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Caserío de Nina Rumi, San Juan Bautista, Maynas, Perú. Correo electrónico: Inramirez2012@yahoo.es

² Instituto de Medicina Tradicional. IMET-EsSalud. Iquitos, Perú.

³ Facultad de Agronomía. UNAP. Iquitos, Perú.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las poblaciones rurales ribereñas de la cuenca del Amazonas dispone de la pesca, caza y recolección para su sustento. La labor de pesca desarrollada por los campesinos y nativos en estos lugares, se ve "facilitada" frecuentemente con la utilización de especies vegetales con potencial biocida sin tomar en cuenta los probables riesgos toxicológicos que implica el consumo diario de pescado bajo esas condiciones. Investigaciones realizadas indican que plantas con propiedades biocidas se utilizan para regular plagas y enfermedades de cultivos (Arming y Velásquez, 2000).

El *Clibadium asperum* (huaca), pertenece a la familia Asteraceae; es una especie arbustiva que crece en forma silvestre en bosques secos y húmedos tropicales; se encuentra ampliamente distribuida en la selva del Perú (Evans y Raffauf, 1990).

La población tikuna, los kubeos y quechuas, utilizan la planta de *Clibadium* sp. como carnada en sus actividades de pesca; los kofans, mirañas y yukunas usan las hojas, mientras que los secoyas utilizan las hojas mezcladas con los frutos molidos de la palma y en forma de bolas como cebo para envenenar peces (Evans y Raffauf, 1990).

El estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos tóxicos del EAL y la FM utilizando animales de experimentación para intentar rescatar información respecto a su uso en la actividad pesquera en los ríos de Loreto, para que se desarrolle el manejo controlado y adecuado de plantas con actividad biocida.

MATERIAL Y MÉTODO

Las hojas se recolectaron en el caserío de Lamas-Tiphisca, Intuto (río Tigre). La determinación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad

Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), registro 028-USM-03. La extracción en agua 1:10 (P/V), se efectuó durante dos horas a fuego lento (70 °C) con agitación constante; luego se decantó, filtró, congeló y liofilizó.

En el tamizaje fitoquímico se empleó la técnica descrita por Ulsoy y Mshin, 1984 y Lock, 1994. Se utilizó EAL; metanol: silicagel (5:1:1,5), para formar "papilla" granular; esta se sembró en la parte superior de la columna. Posteriormente se eluyó utilizando: n-hexano, diclorometano y metanol. Los ensayos cromatográficos se realizaron en silicagel 60F₂₅₄ nm. Las placas fueron observadas en lámparas UV de 365 y 254 nm, y reveladas con reactivos específicos (Wagner y Bladt, 1996).

Para determinar la solubilidad del EAL, se pesaron 5 mg/0,5 mL; se evaluaron utilizando solventes de polaridad decreciente. Los animales fueron sometidos a tratamientos con dosis establecidas de EAL y fracción metanólica (FM). Se evaluó el efecto en los animales con pre y pospruebas (Lapa, 1998).

La toxicidad aguda se determinó mediante el método de Clases Tóxicas Agudas (CTA) (Boissier y Simon, 1962; Boissier *et al.*, 1961). La toxicidad subcrónica, mediante el método Dosis Repetida, en ratones albinos de ambos sexos (ICH, 1996; NIH, 1995; OECD, 1992).

Se tuvo en consideración criterios de protección de los derechos de los animales. La DL₅₀ se determinó por análisis de regresión lineal (Zbinden y Flury-Roversi, 1981). La prueba del test t de Student y Anova, del programa SPSS-15, para calcular las significancias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas tóxicas han sido tradicionalmente utilizadas para satisfacer las necesidades de alimentación y protección.

La pesca con plantas biocidas es una modalidad común que utilizan los habitantes de la selva amazónica, a pesar de las normas sanitarias y reglamentación, que lamentablemente no se aplican en toda su magnitud.

El extracto acuoso liofilizado (EAL) de *Clibadium asperum* contiene alcaloides, triterpenos-esteroides, saponinas, quinonas, flavonoides, cumarinas y glicósidos; carotenos, aceites esenciales y grasas, azúcares reductores, fenoles y taninos, aminas y aminoácidos, principios amargos y astringentes. En la fracción metanólica, usando cromatografía de capa fina en silicagel 60 F₂₅₄nm, sistema Tol:AcOEt 40:60, se identificaron esteroides; esteroides y glicósidos triterpénicos con reactivo de Liebermann-Burchard; flavonoides con revelador de CIAI₃ en C₂H₅OH 1%; terpenos, sapogeninas-esteroides con SbCl₃; alcaloides con revelador de Wagner.

Con dosis de 2000 y 1000 mgkg⁻¹, hubo mortalidad del 100% dentro de las 24 horas, con mayor mortalidad en ratones machos (70%) en los primeros 30 minutos, con respecto a las hembras (50%). Con dosis de 700 mgkg⁻¹ vía oral del EAL, se manifestó 60% de muertes en machos y 40% en hembras, en las primeras 24 horas.

Con dosis de 250 mgkg⁻¹ vía oral, no se evidenció mortalidad en ambos sexos. La DL₅₀ vía oral en ratones machos varió entre 400 y 670 mgkg⁻¹; y entre 410 y 620 mgkg⁻¹ en ratones hembras, considerándose el EAL como dañino.

Luego de la administración del EAL, los animales experimentaron reconocimiento del medio, acicaleo, tracción y fuerza motora normal antes de los tres minutos.

Posteriormente, la totalidad de los animales (mayor incidencia en dosis mayores), manifestaron disminución de la actividad

motora y actividad exploratoria, ataxia, temblores, tono muscular disminuido, midriasis, vasodilatación, enrojecimiento de la cola, salivación, retorcimiento, en algunos casos se observó piloerección-contracción del tejido eréctil del folículo piloso.

Los cambios en la velocidad, profundidad y dificultad en la respiración con descarga nasal incolora; probablemente se deban a que el extracto incrementa la función colinérgica a nivel del centro respiratorio, especialmente en glándulas secretoras, músculos lisos bronquiales.

Lars y Alarcón, 2008, consideran que la rotenona y derivados presentes en estas plantas interfieren con la respiración celular a nivel mitocondrial. Evans y Chaffin, 2000, indican que el efecto pesticida se debe al icthyotereol y compuestos poliacetilénicos. Niveles elevados de potasio, explican que dentro de las manifestaciones clínicas, se observó debilidad muscular y que progresó hasta parálisis respiratoria. La disminución de Ca⁺⁺, manifestó irritabilidad neuromuscular y tetania, con parestesias periféricas y espasmos en las patas traseras.

La mayoría de ratones albinos expresaron excitación central mediante respuesta al sobresalto, signo de Straub, temblor con marcha titubeante, marcha anormal, seguida de convulsiones clónicas, con alternancia de contracción y relajación de los músculos. En la mayoría de ratones muertos, se observaron coágulos sanguíneos en los miembros posteriores. El pentilentetrazol induce la aparición de contracciones clónicas generalizadas (Czuczwar y Frey, 1986).

El extracto de *C. asperum* manifestó signos de naturaleza convulsivante caracterizados por falta de aire y arqueado de la espalda y cabeza del animal, acompañado de disminución del tono muscular, micción involuntaria e incremento de la motilidad intestinal,

manifestando probable acción sobre el sistema nervioso autónomo a nivel del sistema respiratorio neuromuscular.

Costa *et al.*, 2003; establecen que el prolongamiento de la repolarización y la disminución de la excitabilidad atrial, parecen estar relacionados a la acción convulsivante del cunambi (*Clibadium surinamense*).

La disminución de la actividad motora espontánea, curiosidad, acicaleo, así como la disminución de los reflejos y la reacción ante la inducción del dolor se observaron en ambos sexos. Los ratones tuvieron incapacidad para controlar y coordinar movimientos, y en la mayoría de los casos, experimentaron una postura corporal gacha; con manifestaciones de temblor, con mayor incidencia en machos. Estos resultados sugieren que el extracto posee acción ansiolítica o depresora central y relajante muscular, y que será mejor caracterizado usando otras metodologías y aislando los principios activos responsables.

Además, se manifestó enrojecimiento de la cola, excesiva secreción de saliva; estos signos experimentados, se deberían a que los tejidos, órganos o sistemas, involucrados serían el neuromuscular y el sistema nervioso central sensorial y autónomo; que tienen atributos esenciales en el conocimiento, emociones, pensamiento, conducta, memoria y aprendizaje; mientras que el autónomo además, participa en funciones como la respiración, funcionamiento vascular y

cardiaco, secreciones de glándulas exocrinas y endocrinas, actividad de músculos lisos (Rice y Thompson, 2001; Chapman, 2001).

En la prueba de retroceso los animales experimentan perjuicio en la coordinación motora (100 mg/kg; $p < 0,001$). En la prueba de fuerza de agarre existe relajamiento muscular ($p < 0,001$). El 15% de ratones machos y el 25% de ratones hembras evidencia síndrome de Straub.

Escobar *et al.*, 2002, en su estudio sobre especies vegetales promisorias en el control de hormigas, determinan que el follaje de *Clibadium asperum* ocasiona alteración temporal en el funcionamiento del hormiguero, así como la reducción en la actividad de forrajeo y movimientos extraños en algunas hormigas obreras.

Con la dosis de 500 mgkg^{-1} y según la evaluación realizada quince días después de administrado el EAL, se evidenció disminución de triglicéridos ($F = 10,606$, $p < 0,01$) y creatinina ($F = 15,214$, $p < 0,001$) en ratones machos; no significativa para el caso de hembras; triglicéridos ($F = 3,672$, $p = 0,0544$) y creatinina ($F = 3,087$, $p = 0,080$). Disminución de TGP en ratones hembras ($F = 4,697$, $p < 0,05$), y machos ($F = 2,29$, $p = 0,1379$).

En la tabla 1 se presenta la evaluación hematológica de ratones albinos administrados con *Clibadium asperum* con dosis de 500 mgkg^{-1} .

Tabla 1. Evaluación hematológica de ratones albinos administrados con 500 mgkg^{-1} de EAL de hojas de *Clibadium asperum*.

Evaluación	Machos (\bar{u})	Hembras (\bar{u})	Valor normal *
Leucocitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	$4,486 \times 10^3 \pm 1,44$	$8,557 \times 10^3 \pm 2,74$	4,0 - 12,0
Linfocitos (%L)	$3,936 \pm 1,138$	$6,786 \pm 1,436$	3,0 - 8,5

Continúa -->

Evaluación	Machos (\bar{u})	Hembras (\bar{u})	Valor normal *
Células intermedias (%)	0,1459 ± 0,0097	0,4860 ± 0,3240	
Neutrófilos (%G)	0,1143 ± 0,037	0,072 ± 0,048	0,7 - 4,0
Eritrocitos ($10^6 / \text{mm}^3$)	5,542 ± 0,4212	6,226 ± 0,532	
Hemoglobina (g / dL)	11,957 ± 1,73	10,74 ± 0,952	10 - 19
Hematocrito (%)	30,114 ± 2,66	29,41 ± 2,92	41,5 %
Volumen corpuscular medio (fL)	47,843 ± 1,183	47,44 ± 1,008	
Hb corpuscular medio (pg)	17,629 ± 1,008	17,080 ± 0,701	
Conc. media de Hb corpuscular (g / dL)	37,857 ± 0,9981	36,27 ± 1,524	
Amplitud de distribución de eritrocitos (%)	17,829 ± 1,258	18,74 ± 1,354	

*Arnold et al., 1990

*British Toxicology Society, 1984

Los resultados evidencian disminución de hematocrito ($p < 0,01$) y hemoglobina en ambos sexos; podría deberse a un proceso inflamatorio crónico o intoxicación por el extracto; esto se corrobora con la disminución de los niveles del volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH); estos valores podrían deberse a anemias microcíticas o indicar un estado hipocrómico como consecuencia de una disminución anormal del contenido de hemoglobina del eritrocito o a una anemia nutricional (Morrison, 1998; Wallach, 2003; Montgomery, 1955).

Marcano y Hasegawa, 1991, indican que las saponinas alteran la permeabilidad de las membranas celulares, como el caso de la he-

mólisis, que los convierte en veneno para los peces al penetrar por las agallas y causar la expulsión de electrolitos celulares.

Con la dosis de 5 y 10 mgkg^{-1} /vía oral/30 días, no se manifestó mortalidad. Al término del tratamiento, la totalidad de los animales evidenciaron disminución del tono muscular, actividad motora espontánea y exploratoria; ataxia, temblores finos; salivación; en algunos casos piloerección y retorcimiento; irritación de la mucosa gástrica, mayor en machos que en las hembras.

En las figuras 1, 2 y 3 se presentan los porcentajes de leucocitos, linfocitos y segmentados de ratones albinos sometidos a tratamiento con EAL y FM a la dosis de 5 y 10 mgkg^{-1} durante treinta días.

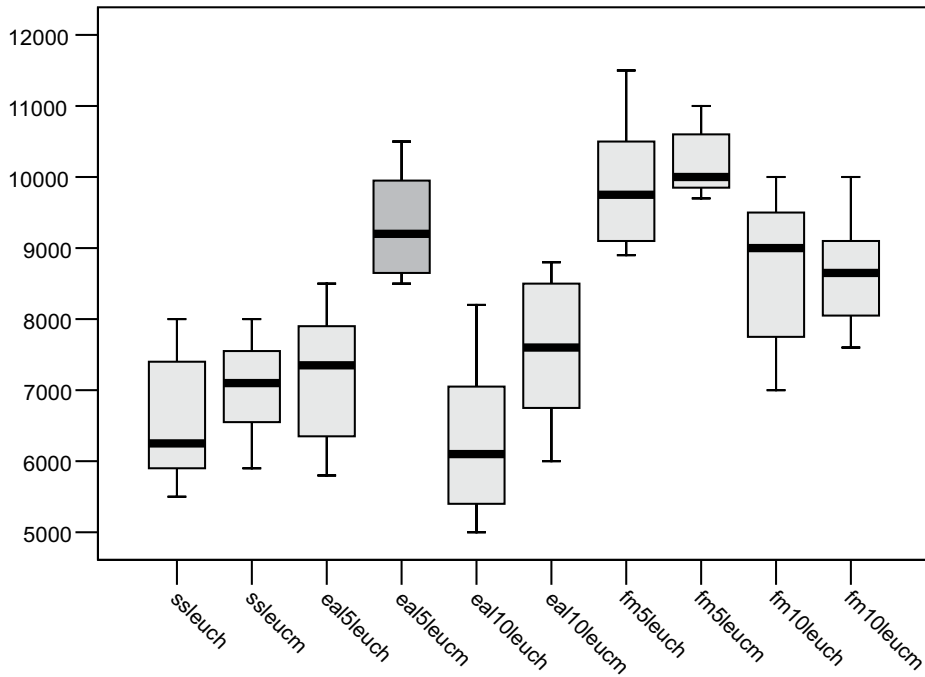


Figura 1. Porcentajes de leucocitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$).

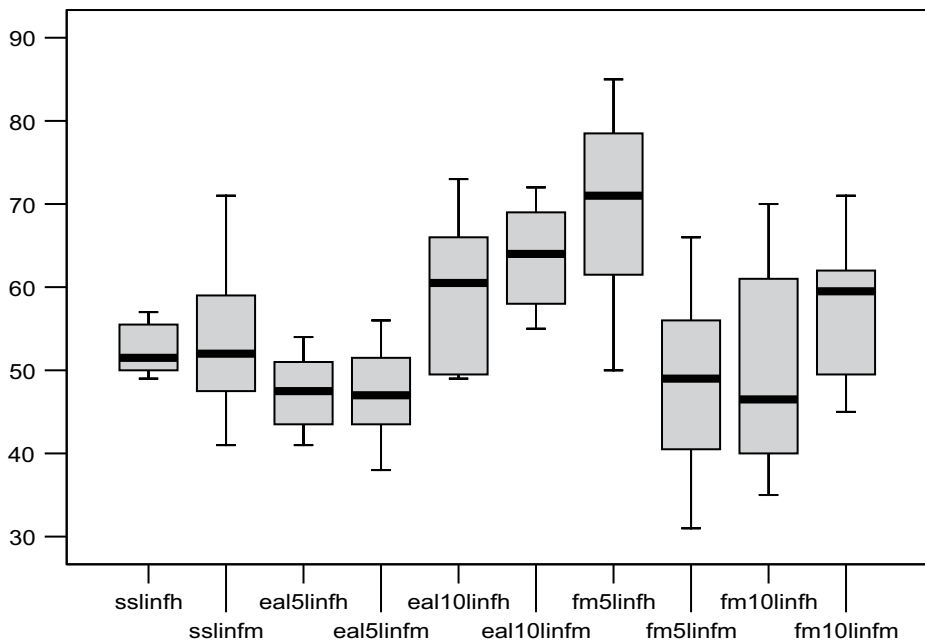


Figura 2. Porcentajes de linfocitos.

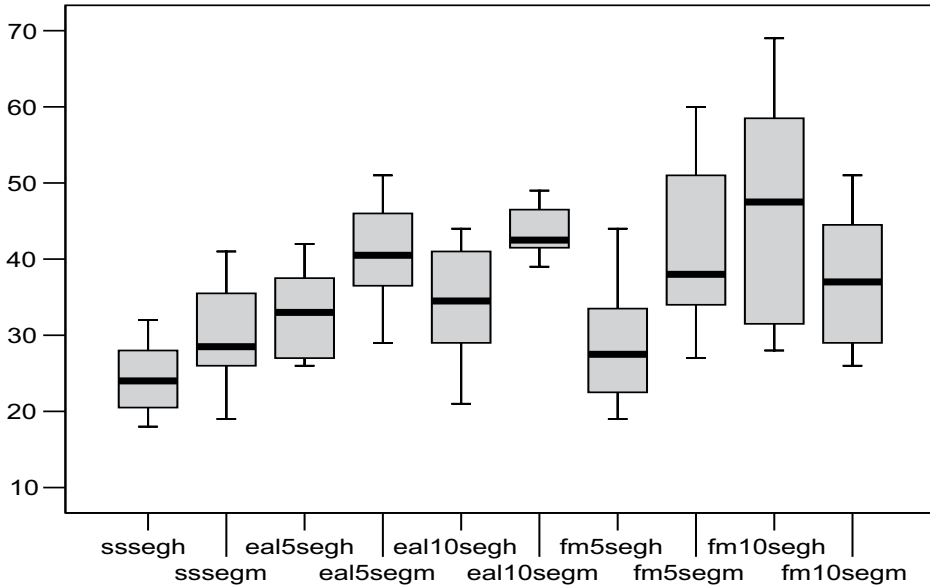


Figura 3. Porcentajes de segmentados.

Se encontró incremento de leucocitos, linfocitos y segmentados en ambos sexos. El mayor efecto se manifestó al administrar FM a la dosis de 5 mgkg⁻¹.

El incremento no significativo de leucocitos podría atribuirse a infecciones agudas producidas por intoxicación metabólica del extracto.

En las figuras 4, 5 y 6 se presentan los porcentajes de eosinófilos, monocitos y abastados de ratones albinos sometidos a tratamiento con EAL y FM a la dosis de 5 y 10 mgkg⁻¹ durante treinta días.

Los resultados evidencian que no se presenta una variación significativa en los porcentajes.

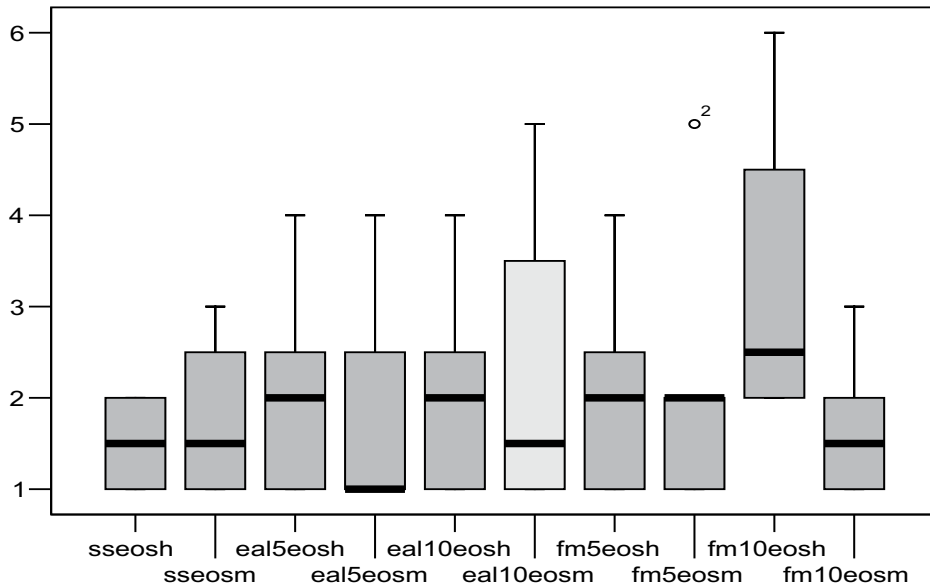


Figura 4. Porcentajes de eosinófilos.

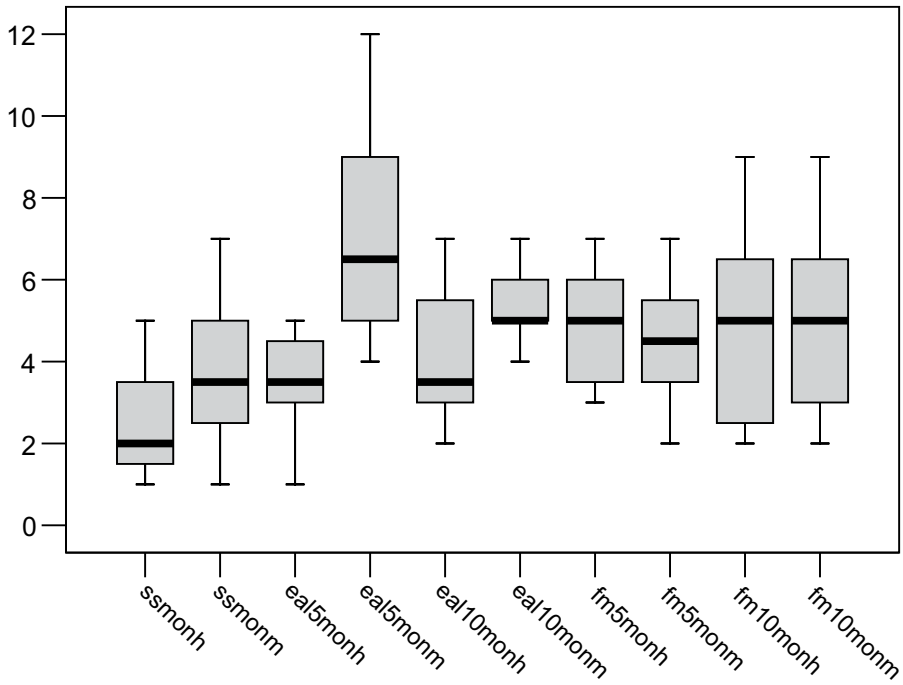


Figura 5. Porcentajes de monocitos.

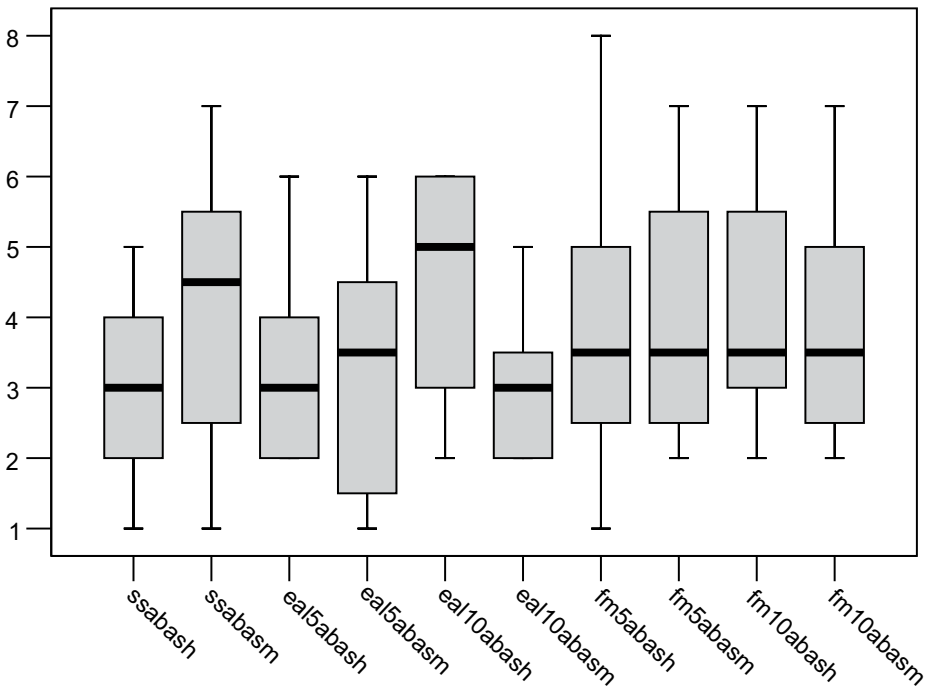


Figura 6. Porcentajes de abastonedos

La linfocitosis, monocitosis y eosinofilia pueden relacionarse con la fase de recuperación de un proceso inflamatorio o a reacciones al extracto.

valores promedio de creatinina, fosfatasa alcalina y TGP de ratones albinos sometidos a tratamiento con EAL y FM a la dosis de 5 y 10 mgkg⁻¹ durante treinta días.

En las figuras 7, 8 y 9 se presentan los

Se encontró incremento de los valores de

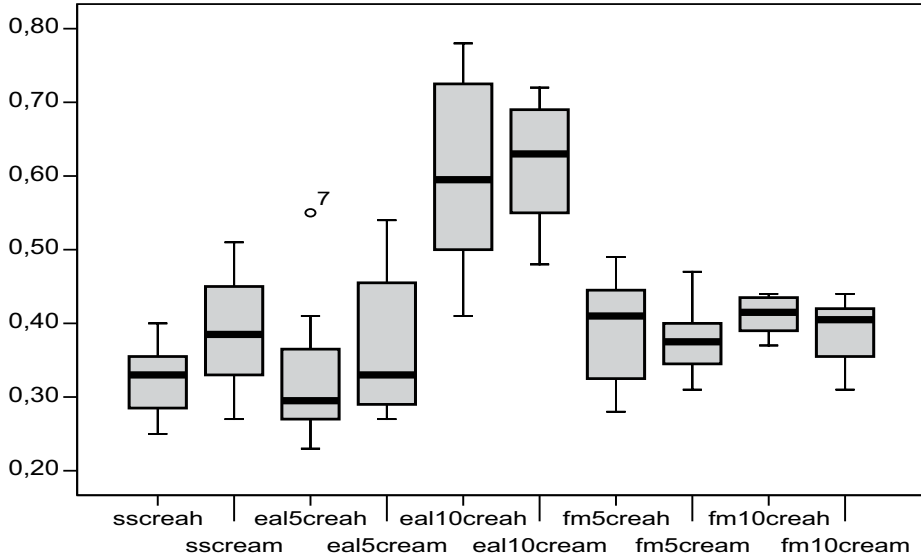


Figura 7. Creatinina (mg/dl).

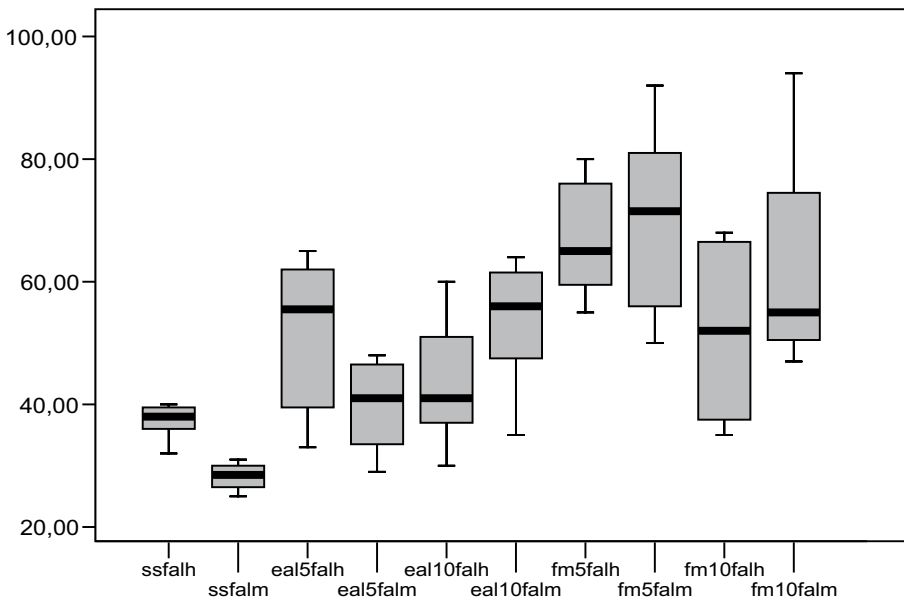


Figura 8. Fosfatasa alcalina (U/l).

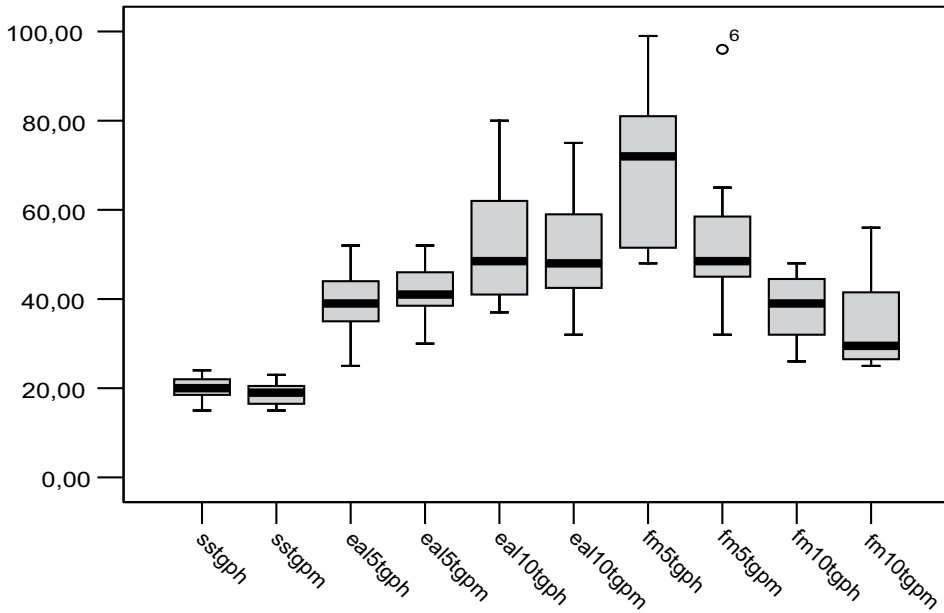


Figura 9. TGP (U/L).

creatinina y fosfatasa alcalina al administrarse FM a la dosis de 5 mgkg⁻¹, mientras que se incrementó TGP al administrarse FM a la dosis de 10 mgkg⁻¹. Se evidenció incremento de los niveles de K⁺ y disminución de los valores de Ca⁺⁺.

La disminución de creatinina podría atribuirse al proceso de desgaste muscular, debido a una reducción en la masa muscular corporal total; sin embargo, durante el tratamiento subcrónico, estos niveles se mantuvieron dentro de los valores normales.

Los valores de TGP y fosfatasa alcalina se encuentran incrementados en la prueba de toxicidad subcrónica, debido a una probable disfunción renal como consecuencia de la administración prolongada del extracto, que se manifiesta en defectos en el metabolismo del calcio.

Se evidenció la actividad analgésica con la dosis de 50 mgkg⁻¹ y resultó significativa y con certeza una interferencia del extracto en el sistema nervioso y en la función de la musculatura esquelética. Esto puede ocurrir por inhi-

bición de la estimulación nociceptiva visceral o de la inhibición de los mediadores inflamatorios del peritoneo.

Se comprobó la toxicidad de *Clibadium asperum* (huaca), en roedores, con efectos predominantes a nivel hematológico y sobre el sistema nervioso. Se deben difundir los riesgos que implica la utilización de especies vegetales con potencial biocida en el aprovechamiento de los recursos hidrobiológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arming I, Velásquez H. 2000. Recursos botánicos con potencial biocida. Nuevos aportes. Red de acción en alternativa al uso de agroquímicos (RAAA). Lima, Perú.
- Arnold DL, Grice HC, Krewski DR. 1990. Handbook of In vivo Toxicity Testing. Academic Press Inc. New York.
- Boissier JR, Dremont C, Robine R, Pagny J. 1961. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 133: 29-32.

- Boissier JR, Simon P. 1962. Therapie. 17: 1225 pp.
- British Toxicology Society Working partion toxicity. 1984. A new approach to the classification of substances and preparations on the basic of their acute toxicity. Human toxicol. 3, 85-92.
- Chapman MG. 2001. Status epilepticus. Anaesthesia. 56: 648-59.
- Costa EA, Rocha FF, Torres LMB, De Lima TCM, Lapa AJ, Lima-Landman MTR. 2003. Efeito da Fracao convulsivante do extracto hexanico de folhas e caules de *Clibadium surinamense* Linn (cunanbi) en Atrio esquerdo de rato. XXXV Congreso Brasileiro de Farmacologia. Setembro 2003.
- Czuczwar SJ, Frey HH. 1986. Neuropharmacology, 25 (5): 465-69.
- Escobar R et al. 2002. Hormigas cortadoras de la tribu *Attini* en sistemas productivos del departamento del Chocó. Revista institucional n.º 15. Universidad Tecnológica del Chocó. Quibdó. Pp. 35-41.
- Evans DK, Chaffin DW. 2000. Ethnobotany and secretory reservoir anatomy in leaves and bracts of Amazonian *Clibadium surinamense* L. (Asteraceae). Herbarium (MUHW). Marshall University, Huntington, West Virginia, USA and Herbarium QCA, Catholic University, Quito, Ecuador.
- Evans SR, Raffauf RF. 1990. The Healing Forest. Medicinal and toxic plants of the North West Amazonia. Pp.136-137.
- International Conference on Harmonization of technical requeriments for registration of pharmaceutical for human use (ICH). 1996. Unión Europea, Japón, USA. Pp. 1-9.
- Lapa J. 1998. Métodos farmacológicos para la validación de plantas medicinales. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. Cyted-Rivaplamed.
- Lars PK, Alarcón D. 2008. Plantas Tóxicas. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Herbario QCA y Herbario AAU, Quito y Aarhus. 2008: 99-104.
- Lock de UO. 1994. Investigación Fitoquímica. PUCP. Lima, Perú.
- Marcano D, Hasegawa YM. 1991. Fitoquímica Orgánica. Caracas (Venezuela): CDCHT. UCV. 451 pp.
- Montgomery KC. 1955. J. Comp. Physiol. Psychol. 48: 254-260.
- Morrison K. 1998. Laboratorio clínico y pruebas de diagnóstico. Ed. Manual Moderno. México DF.
- National Institute of Health (NIH). 1995. Guide for the care and use of laboratory animals US. Dpt. Health and Human services. Public. 86: 23 pp.
- OECD Guideline for testing of chemicals. 1992. Acute oral toxicity-fixed-dose method. 420 pp.
- Rice JE, Thompson PD. 2001. Movement disorders II: The hyperkinetic disorders. MJA. 174: 413-420.
- Ulso FC, Mshin EN. 1984. Phytochemical screening of Tanzanian medical plants J. Etnopharmacol. 11: 157-159.
- Wagner H, Blatt S. 1996. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography.

Atlas 2da. Ed., Berlín.

Wallach J. 2003. Interpretación clínica de pruebas de laboratorio. Ed. Masson. México DF.

Zbinden G, Flury-Roversi M. 1981. Significance of the LD50. Test for the toxicological evaluation of chemical substance. Arch. Toxicol. 30, 77-99.