

Determinación de la Citotoxicidad de Extractos de *Erythroxyllum confusum* Britt. mediante el Método de la *Artemia salina*

Ioanna MARTÍNEZ-HORMAZA, Gipsy QUINTERO-RODRÍGUEZ, Lucía MÁRQUEZ-MONTIEL,
José A. GONZÁLEZ-LAVAUT*, Alfonso ÁLVAREZ-REYES & Alain ZARRAGOITÍA

Centro de Química Farmacéutica, Ave 200, Esq. 21, Atabey, Playa,
Apdo. Postal 6990, La Habana, Cuba.

RESUMEN. El género *Erythroxyllum* muestra una gran variedad en cuanto a sus actividades biológicas. Para su estudio se determinó la citotoxicidad preliminar de extractos de *E. confusum* Britt. evaluando las diferentes épocas de colecta, los tipos de preparación de extractos y del método de secado; mediante un bioensayo con camarones de mar (*Artemia salina* Leach). Para ninguno de los ensayos realizados, el valor promedio de la CL₅₀ se comportó por debajo de 640 µg/mL. De manera general las preparaciones obtenidas de la especie estudiada se pueden considerar como no tóxicas, según el método de la *Artemia Salina*, lo que permite continuar la realización de experimentos biológicos para evaluar sus efectos farmacológicos.

SUMMARY. "Cytotoxicity of Extracts from *Erythroxyllum confusum* Britt. determined by the *Artemia salina* Bioassay". The *Erythroxyllum* genus shows a great variety for its biological activities. Preliminary cytotoxicity of *E. confusum* Britt. extracts was determined by the brine shrimp (*Artemia salina* Leach) bioassay, evaluating different collection times, types of extracts and dry method using. The value of CL₅₀ behaved below 640 µg/mL in all experiment. The extracts can be considered not toxic, according to the *Artemia salina* bioassay, what allows continuing the realization of biological experiments to evaluate their pharmacological effects.

INTRODUCCIÓN

El género *Erythroxyllum* se encuentra bien representado en la flora cubana con la existencia de 21 especies, de las cuales 16 son endémicas¹. Especies de este género muestran una gran variedad en cuanto a sus actividades biológicas, tales como herbicida, antimicrobiano y estimulante, entre otras²⁻⁴.

En 1982, Meyer *et al.* desarrollaron un bioensayo para la determinación de citotoxicidad con la utilización de camarones de mar (*Artemia salina* Leach). El método se caracterizó por su rapidez, confiabilidad y bajo presupuesto para su ejecución^{5,6}. Es utilizado como vía inicial de tamizaje citotóxico de extractos para discriminar aquellas muestras de elevada toxicidad, debido a que presenta buena correlación con la toxicidad *in vitro*⁷.

El objetivo de este trabajo es evaluar la citotoxicidad preliminar de extractos de hojas de la especie *Erythroxyllum confusum* Britt. evaluando las diferentes épocas de colecta, los tipos de preparación de extractos y del método de secado utilizado, para predefinir la continuidad del trabajo de investigación científica con esta especie botánica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de hojas de *Erythroxyllum confusum* Britt. fueron colectadas en diferentes épocas y años en la provincia de Pinar del Río y autenticadas por el Dr. Armando Urquiola, Director del Jardín Botánico de Pinar del Río. Estas fueron secadas a la sombra a temperatura ambiental por 20 días y posteriormente molinadas hasta polvo. Las muestras se prepararon en for-

PALABRAS CLAVE: *Erythroxyllum confusum*, *Artemia salina*, Citotoxicidad, Cuba.

KEY WORDS: *Artemia salina*, *Erythroxyllum confusum*, Cuba, Cytotoxicity.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. Email: josea.lavaut@infomed.sld.cu

ma de infusión (I), decocción (D) o extracto hidroalcohólico (HA) de acuerdo a procedimientos reconocidos ⁸. En particular los extractos HA de las especies colectadas en el 2000 y 2001 se realizó una extracción con acetato de etilo y se evaluó dicho extracto (HA-AcOEt) y su residuo (HA-Fs). La evaluación del tipo de secado (sombra, sol y estufa) se realizó con el material vegetal colectado en Noviembre del 2003 con extracto del tipo hidroalcohólico.

La actividad citotóxica de las muestras se realizó de acuerdo al procedimiento modificado por Meyer *et al.* ⁶. Los quistes de *Artemia salina* fueron donados por CINVESTAV-México y almacenados en un lugar seco a una temperatura estable de 25 °C. En el ensayo se empleó agua de mar natural procedente de la costa norte del municipio Playa en la Ciudad de La Habana, Cuba. Para la eclosión de los huevos se utilizó una cámara de 2 compartimentos (uno oscuro y el otro iluminado por una lámpara de neón colocada a una distancia aproximada de 30 cm). Durante el tiempo de incubación se mantuvo un flujo constante de aire para garantizar la eclosión. Se utilizaron 10 larvas o nauplios que se sometieron a las concentraciones de 10, 100, 1000 µg/mL de los extractos utilizados. Además, se incluyó un grupo control con todos los elementos del ensayo, excepto la muestra a ensayar, con tres réplicas para cada grupo. Luego de 24 h se contaron los nauplios vivos y muertos para de esta forma determinar la concentración letal 50 (CL₅₀) mediante la curva de mejor ajuste por el programa para Windows CurveExpert Versión 1.34. Se tomó como valor de referencia de toxicidad un valor inferior a CL₅₀ 640 µg/mL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la CL₅₀ y la regresión lineal (r) para cada tipo de extracto de acuerdo a cada fecha de colecta. Pa-

ra todos los casos la eclosión de los huevos comenzó a ocurrir aproximadamente a partir de las 20 h bajo las condiciones antes descritas para los ensayos realizados. La viabilidad en el grupo control fue del 100% y no se observaron alteraciones en el comportamiento.

Para ninguno de los ensayos realizados, el valor promedio de la CL₅₀ se comportó por debajo de 640 µg/mL y en todos los casos la regresión lineal de la curva (r) fue mayor de 0,99, por lo que se considera a todas las muestras como no tóxicas. Así, las distintas fracciones obtenidas de la planta en las diferentes épocas del año, no mostraron toxicidad frente al ensayo realizado, por lo que se sugiere que los metabolitos secundarios presentes en cada una de las fracciones, independiente de la época de colecta y del tipo de extracto, no tienen un efecto significativo sobre la toxicidad de estos.

En la Tabla 2 se expresan los resultados de la evaluación de la toxicidad de acuerdo al tipo de secado para la especie colectada en noviembre del 2003, para el extracto hidroalcohólico. En todos los casos los valores de CL₅₀ son superiores a 640 µg/mL, para estos extractos donde se estudia el método de secado, por lo que se considera que la forma de secado de las plantas tampoco ocasiona variaciones en la toxicidad de los componentes presentes en las hojas. Se puede concluir que en general las preparaciones

Tipo de secado	CL ₅₀ (µg/mL)	r
Sol	714.95	0.9966
Sombra	886.09	0.9997
Estufa	1031.69	0.8098

Tabla 2. Evaluación citotóxica (CL₅₀) mediante el método de *Artemia salina* de extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Erythroxyllum confusum* Britt., con diferentes métodos de secados.

Tipo de Extracto	Fecha de Colecta							
	Septiembre /2000		Abril/2001		Mayo/2003		Noviembre/2003	
	CL ₅₀	r	CL ₅₀	r	CL ₅₀	r	CL ₅₀	r
HA	1820,40	0,9988	1064,81	0,9988	906	0,9979	1048,54	0,9999
I	1286,88	0,9988	945,65	0,9988	3359,39	0,9988	753,77	0,9966
D	815,83	0,9988	3088,79	0,9988	1519,41	0,9988	3044,88	0,9977
HA-AcOEt	1230,47	0,9985	>1000	-	-	-	-	-
HA-Fs	>1000	-	>1000	-	-	-	-	-

Tabla 1. Evaluación citotóxica (CL₅₀) y coeficiente de correlación (r) de extractos de hojas de *Erythroxyllum confusum* Britt., de diferentes épocas de recolección, mediante el método de *Artemia salina*.

obtenidas de la especie estudiada se pueden considerar como no tóxicas, según el método de la *Artemia Salina*, esto permite continuar la realización de experimentos biológicos para evaluar los efectos farmacológicos de estos tipos de extractos para esta especie que crece en nuestro país.

Agradecimientos. Los autores desean agradecer el soporte brindado por el Proyecto Ramal MINSAP/Cuba (Código 411008) para la ejecución del trabajo y a la Lic. Leonora González Mesa por la liofilización de los extractos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. González, K., J.A. González, J.L. González & S. Prieto (2005) *Acta Farm. Bonaerense* **24**: 274-81.
2. Srinivasan, P., S. Nathan, T. Suresh & P.L. Perumalsamy (2001) *J. Ethnopharmacol.* **74**: 217-20.
3. Payo Hill, A.L., R.S. Domínguez, M.O. Suárez, B. Báez, M. Vélez, H.T. Castro, L. Rastrelli & R. Aquino (2000) *Phytochemistry* **54**: 927-32.
4. Schabra, S.C., F.C. Ulso & E.N. Mshiu (1984) *J. Ethnopharmacol.* **11**: 157-79.
5. Sánchez, V., D. Sandoval, P. Herrera & M. Oquendo (1982) *Rev. Cubana Farm.* **16**: 39-44.
6. Roig Mesa, T.J. (1965) "Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba". Ed. Ciencia y Técnica, Instituto del Libro, La Habana, Págs. 540-1.
7. Blasco, G. & G.A. Cordell (1988) *Heterocycles* **27**: 1269-300.
8. González, J.L., J.A. González, S. Pino, M. García, M.T. Carballo, O. Echemendía, J. Molina & S. Prieto (2004) *Acta Farm. Bonaerense* **23**: 506-9.