

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Evaluación de la toxicidad aguda por el método de las clases del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet.

Dr. MVZ Daniel Francisco Arencibia Arrebola, MSc¹; Lic. Luis Alfredo Rosario Fernández, MSc²; Diplo Jessica Narciandi Lorenzo²; Lic. Dayisell Curveco Sánchez; Lic¹. Livan Delgado Roche, MSc³; Dr. MV Yolanda Emilia Suárez Fernández, DrC⁴; Lic. Alexis Vidal Novoa, DrC⁵.

1. Instituto Finlay, Habana, Cuba. darrebola@finlay.edu.cu
2. Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, U.H), Habana, Cuba.
3. Centro de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CIEB, IFAL-U.H), Habana, Cuba.
4. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAH, Mayabeque, Cuba.
5. Facultad de Biología, U.H, Habana, Cuba.

Resumen

El extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* tiene diversos usos biomédicos. Recientemente se evaluó este extracto manifestando grandes potencialidades como antioxidante en ensayos *in vivo*. El objetivo de este trabajo fue determinar la máxima dosis no tóxica del extracto administrado por vía oral mediante el ensayo de toxicidad aguda por el método de las clases en ratas Sprague Dawley de ambos sexos. El extracto administrado en dosis única de 2000 mg/kg por vía oral no modificó en peso corporal, consumo de agua y consumo de alimentos. Tampoco se observaron lesiones anatomopatológicas de interés tóxico durante el estudio. En función de los resultados obtenidos se concluye que el extracto oleoso evaluado no fue potencialmente tóxico al ser administrado en dosis única por vía oral en el biomodelo de ratas SD en ambos sexos.

Palabras claves: toxicidad aguda, método de las clases, *Carapa guianensis*, extracto oleoso.

Abstract

Assessment toxicity of classes test acute of *Carapa guianensis* Aublet seed oleaginous extract.

The seed oil extract of *Carapa guianensis* has various biomedical applications. Recently this extract was evaluated for expressing great potential as antioxidant on *in vivo* assays. The aim of this work was determined the maximum non toxic dose of the extract administered via oral by means of classes test acute toxicity in Sprague Dawley rats of both sexes. The extract administered in single dose of 2000 mg/kg via oral did not modify the corporal weight, and water and food intake. The anatomopathological lesions of toxic interest did not observed during the study. In function of the obtained results it concluded that the oleaginous extract evaluated did not toxic potentially when being administered in single dose via oral in SD rat's biomodel, in both sexes.

Key words: acute toxicity, classes' methods, *Carapa guianensis*, oleaginous extract.

Introducción

Carapa guianensis pertenece a la familia Meliaceae, es una planta medicinal muy popular en varios países del mundo; en Cuba es conocida como Cedro Macho.

La caracterización del aceite de la semilla de *Carapa guianensis* ha revelado la presencia de ácidos grasos mirístico, palmítico, oleico, linoleico,^{1,2} esteárico y ácido araquidónico.³ Algunos tetraterpenoides también han sido aislados de la semilla de *Carapa guianensis*.³

También se ha observado que los tetraterpenoides obtenidos de la semilla de la *Carapa guianensis* tienen una significativa actividad antialérgica, dado por la inhibición del factor nuclear κB y la supresión de la IL-5 y el CCL11/eotaxina.⁴

Recientemente se ha descrito el potencial antioxidante, la capacidad como protector solar e insecticida del extracto oleoso de *Carapa guianensis*.⁵⁻⁹ Esta planta abunda en el Caribe especialmente en Belice, Trinidad y Tobago y Cuba.^{6,8,9} Los estudios fitoquímicos de los extractos obtenidos en estas regiones denotan la presencia mayoritaria de ácidos grasos poliinsaturados y de compuestos fenólicos tales como taninos y limonoides.

Una vez que ha sido demostrado su efecto antioxidante mediante la administración oral del extracto durante tres semanas en ratas Sprague Dawley de ambos sexos, co-administradas con una sustancia oxidante donde se demostró su efecto protector a la formación de especies reactivas del oxígeno,⁹ se hace necesaria la evaluación de su nivel de seguridad, al menos en los ensayos de toxicidad clásica de primera y segunda barrera.¹⁰

Teniendo en cuenta estos antecedentes el objetivo de esta investigación fue determinar la máxima dosis no tóxica del extracto administrado por vía oral mediante el ensayo de toxicidad aguda por el método de las clases.¹¹

Materiales y Métodos

Grupos experimentales

Se procedió a distribuir aleatoriamente los animales en 2 grupos experimentales/sexo de 3 animales cada uno. Un grupo recibió la suspensión del producto en estudio (2000 mg/kg) y el otro, volúmenes equivalentes del vehículo (Tween 65 al 2%).¹¹ La administración del producto se realizó una vez y las determinaciones de peso, consumo de agua, de alimentos y observaciones clínicas se realizaron semanalmente mientras que los análisis anatomopatológicos se realizaron al final del experimento.

Procedencia y condiciones de tenencia de los animales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley adultos jóvenes de ambos sexos (6-8 semanas), cuyo peso corporal osciló entre 163-246 g al término de la cuarentena, manteniéndose en condiciones controladas: temperatura ($25 \pm 2^\circ \text{C}$), humedad relativa (60 % - 10 %) y ciclos de luz- oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento (pienso estándar para esta especie suministrado por el CENPALAB), será *ad libitum*. Estas características fueron comunes para todos los grupos experimentales evaluados en este ensayo. Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de Laboratorio de la República de Cuba.

Obtención del extracto oleoso

Se agregó N-Hexano a razón de 2 kg de semilla de *Carapa guianensis* previamente secado y triturado. Se dejó en reposo por 60 min y luego se filtró al vacío. El solvente se adicionó hasta que la muestra botánica del aceite se saturó y luego fue removido reduciendo presión. El rendimiento del extracto fue del 29 % (v/w). La densidad aparente del aceite fue calculado (0.81 g/mL) y este resultado fue utilizado para definir el volumen exacto que cada animal recibió. El aceite fue conservado a -20°C hasta su uso.

Preparación de las dosificaciones

La preparación de las soluciones se realizó diariamente 2 h antes de la administración en función los valores medios de los pesos corporales por grupos de

experimentación. El extracto se administró en forma de emulsión aceite/agua usando como agente tenso activo Tween 65 (2%). Se propone emplear la vía oral por ser la que coincide con la propuesta en la terapéutica y además la que se empleará en el resto de las evaluaciones de toxicología preclínica.

Determinación del peso corporal

Los animales se pesaron al comienzo y fin del período de adaptación registrando los pesos en aras de seleccionar aquellos que participarían en el estudio. En el momento de la inoculación inicial (Fecha de Inicio experimental) se pesaron los animales para saber peso real de los mismos al comienzo del estudio. Como parte del estudio se realizó el control del peso corporal al inicio, a la semana y al finalizar el estudio.¹¹

Determinación del consumo de agua

El agua se suministró *ad libitum*, se realizó al comienzo del estudio (T0) y luego 2 veces por semana, se midió el remanente de agua con una probeta de 1000 mL; para ello, se depositó 750 mL de agua en el frasco colocado en cada caja de ratas, el volumen remanente se registró y calculó por diferencia el volumen consumido por el grupo. Se procedió a calcular el promedio de alimento consumido/semana/animal.

Determinación del consumo de alimentos

Igualmente se realizó al inicio del estudio (T0) y luego 2 veces/semana, cada vez que se realizó una medición se completó en las tolvas de las cajas 500 g de pienso. Con la ayuda de una balanza técnica se pesó el alimento remanente y se calculó el consumo medio diario por animal, como se describió para el consumo de agua.

Observaciones clínicas y conductuales

Al realizar la administración de la sustancia de ensayo se observaron los animales cada 1 h las primeras 4 h, luego cada 4 h hasta las 12 h de la administración (primer día). A partir de las 24 h de la administración las observaciones se realizaron 2 veces al día hasta completar los 14 días.¹¹ En este estudio se registró la mortalidad y la presencia de los siguientes signos clínicos: alopecia, ataxia, nivel de actividad general, catalepsia, aspecto general, convulsiones, aspecto de la cola, apnea, aspecto de los ojos, disnea, aspecto de los genitales, edema en las patas, aspecto de las heces, epistaxis, aspecto de

la orina, piloerección, características de la marcha, lesiones en la piel, nódulos o absesos, reflejos, ptosis palpebral, taquipnea, lacrimación, salivación, sangrado ocular, temblores.¹¹

Necropsia y exámenes histopatológicos

Pasados 14 días de la única administración, se realizó la autopsia de todos los animales, para lo cual se anestesiaron con éter y se desangraron hasta morir. Se realizó el análisis macroscópico de órganos y cavidades y se examinó el contenido de las cavidades abdominal, torácica y craneana. Se tomaron los órganos para el análisis histopatológico en aquellos donde se observaron daño macroscópico.¹¹

Análisis estadístico

El análisis del peso corporal y el consumo de alimento se realizaron mediante el método de análisis de varianza (ANOVA). El nivel de significación establecido fue de $p < 0,05\%$. Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

Resultados y Discusión

En la figura 1 y 2 se observan los resultados del efecto de la administración oral de extracto evaluado en el peso corporal en ratas SD de ambos sexos, no hubo diferencias significativas entre controles y tratados a los 7 y 14 días de administrado el extracto. El peso corporal del grupo tratado con dosis de 2000 mg/kg se comporto muy similar a los valores históricos reportados para este biomodelo en Cuba.¹² Se destaca que el extracto no es tóxico a nivel sistémico, pues los animales tratados con alta dosis aumentaban de peso de forma considerable. Resultados similares obtuvo Largarto y col., 2003; Gámez y col., 2005^{13,14} al evaluar extractos oleosos obtenidos de fuentes naturales con efecto antioxidante, anestésico, analgésico y antiinflamatorio. Al administrar estos extractos por vía oral en ensayos de toxicidad aguda en ratas de ambos sexos tampoco se modifico el peso corporal.^{13,14}

En la figura 3 y 4 se observan los resultados del consumo de agua en ambos sexos. La administración del extracto a 2000 mg/kg tampoco modificó el consumo de agua, ni hubo diferencias significativas entre los animales tratados con el extracto y los controles. El consumo de agua fue para el caso de las hembras entre 20 y 30 mL como promedio y para el caso de los machos el consumo de agua estuvo entre los 35 y 40 mL. Los resultados del consumo de agua se corresponden con los resultados fisiológicos reportados para esta especie teniendo en cuenta el peso y edad.¹⁵

Por otro lado la administración oral de extracto oleoso tampoco modificó el consumo de alimento (Figura 5 y 6), en ratas SD de ambos sexos. Las hembras consumieron como promedio entre 15 y 20 g de alimento mientras que los machos el consumo fue mayor entre 25 y 30 g diario como promedio. Los machos consumen mucho más alimento que las hembras ya el mismo está directamente correlacionado con el peso corporal y los machos durante el ensayo y al punto final del experimento presentaron pesos mayores y mayor ganancia neta de peso que las hembras.¹⁵ El consumo de alimento promedio por animal se encuentra dentro de los rangos reportados para este especie y coinciden con los reportados por Alemán y col., 1998.¹² La ausencia de

interacciones entre la dosis utilizada del extracto y el sexo, sugiere una baja toxicidad del producto probado y similitud entre los mecanismos de desintoxicación del organismo de este producto en los machos y las hembras.¹³

Durante el ensayo ningún animal experimentó signos y síntomas indicativos de toxicidad. Además no hubo muerte de animales en ningún grupo experimental; ni durante las primeras 24 horas de la administración del producto, ni en los 14 días de observación posteriores a ella. Tampoco se observaron lesiones anatomopatológicas de interés tóxico durante el estudio. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio de toxicidad aguda del D-004 en ratas SD, extracto oleoso con composición muy similar al evaluado.¹³

En función de los resultados obtenidos se concluye que el extracto oleoso evaluado no fue potencialmente tóxico al ser administrado en dosis única por vía oral en el biomodelo de ratas SD en ambos sexos.

Figura 1. Peso corporal de ratas SD hembras.

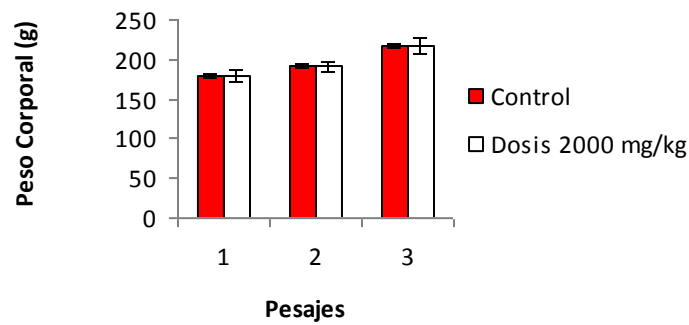


Figura 2. Peso corporal de ratas SD machos.

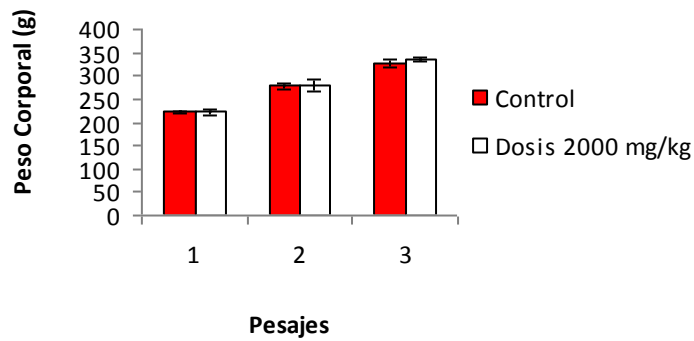


Figura 3. Consumo de agua de ratas SD hembras.

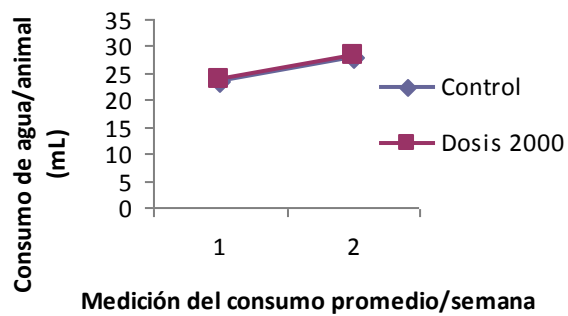


Figura 4. Consumo de agua de ratas SD machos.

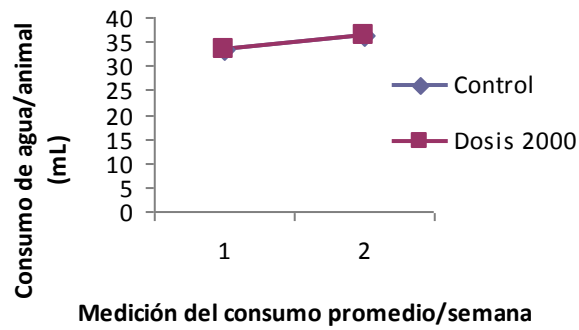


Figura 5. Consumo de alimento de ratas SD hembras.

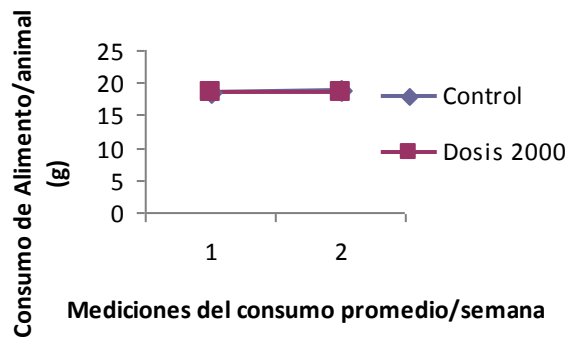
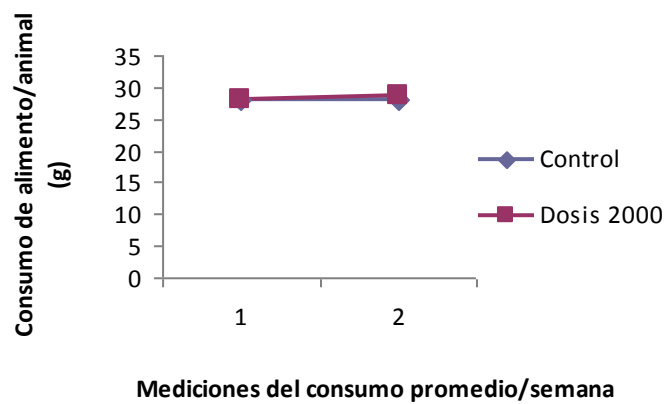


Figura 6. Consumo de alimento de ratas SD machos.



Bibliografía

1. Pinto GP. Contribuicao ao estudo químico do óleo de Andiroba. Boletín Técnico do Instituto Agronómico do Norte. 1956; 31:195-206
2. Teske, M, Trentini AM. Herbarium: Compendio de Fitoterapia. Herbarium Laboratorio Botánico. Paraná; 1997.p.35.
3. Penido C, Costa KA, Pennaforte RJ, Costa MF, Pereira JF, Siani AC, et al. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergeninduced vascular permeability and hyperalgesia. Inflammation Research. 2005; 54:295-303.
4. Penido C, Costa KA, Costa MF, Pereira JF, Siani AC, Henriques MG. Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetranortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/eotaxin and NF κ B activation. International Immunopharmacology. 2006; 6:109-21.
5. Ambrozin A, Leite A, Bueno F, Vieira P, Fernandes JB, Bueno O, et al. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. J Braz Chem Soc. 2006; 17(3):542-7.
6. Ferrari M, Oliveira M, Nakano A, Rocha-Filho P. Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* e *in vivo* de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). Rev Bras Farmacogn. 2007; 17(4):626-30.
7. Gonçalves JF, Silva CE, Guimarães DG. Fotossíntese e potencial hídrico foliar de plantas jovens de andiroba submetidas à deficiência hídrica e à reidratação. Pesq Agropec Brás. 2009; 44(1): 8-14.
8. Tonini H, Arco M. Morfologia da copa para avaliar o espaço vital de quatro espécies nativas da Amazônia. Pesq Agropec Brás. 2005; 40(7):633-8.
9. Alonso A. Evaluación pre-clínica del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* como suplemento nutricional antioxidante. Tesis en opción al título de Licenciado en Ciencias de los Alimentos. IFAL-U.H. Habana, Cuba; 2012.p.1-58.

- 10.** Gámez R, Más R. Aspectos generales de los estudios toxicológicos más empleados. Revista CENIC. 2007; 38(3): 204-8.
- 11.** OECD. Guidelines for testing of chemicals. Acute oral toxicity. Acute Toxic Class Method. No. 423. Revised Draft Guideline October. 2000. Disponible en: URL:<http://www.oecd.org>. Consultado Agosto 2012.
- 12.** Alemán CL, Mas RM, Rodeiro I, Noa M, Hernández C, Menéndez R, et al. Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months. Lab Animals 1998;32:457-66.
- 13.** Gámez R, Mas R, Noa M, Menéndez R, Garcia H, Rodríguez Y, et al. Oral acute and subchronic toxicity of D-004, a lipid extract from Roystonea regia fruits, in rats. Drugs Exp Clin Res 2005;31(3):101-8.
- 14.** Lagarto A, Bueno V, Vega R, Guerra I, Vega Y. Toxicidad aguda oral e irritación sobre mucosa bucal del extracto oleoso de Melanthera deltoidea Mich. Rev Cubana Plant Med [online] 2003; 8(3). Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962003000300008&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1028-4796. Consultado Diciembre 2013.
- 15.** Shayne CG. Animal Models in toxicology. Chapter Toxicology. Second edition. New York (U.S.A): Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group, LLC; 2007.p. 24-72.

Recibido: 03/12/13

Aceptado: 06/12/13