

Actividad ictiotóxica y citotóxica de extractos de plantas Chrysobalanaceae, Melastomataceae, Rubiaceae y Rutaceae, de la flora Colombiana

Ichthyotoxic and cytotoxic activity from plants extracts Chrysobalanaceae, Melastomataceae, Rubiaceae and Rutaceae from Colombian plants

Luz Stella Ramírez Aristizabal Ph.D^{1*}, Darwin Marín Q.I²., Francisco Javier Jiménez González Q.I³
Grupo Polifenoles, Escuela de Química, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia
luramire@utp.edu.co

Resumen— Se evaluó la actividad ictiotóxica y citotóxica de diez plantas pertenecientes a familias Chrysobalanaceae, Melastomataceae, Rubiaceae y Rutaceae. Se obtuvieron los extractos acuoso y butanólico, los cuales fueron evaluados frente a peces guppy (*Poecilia reticulata*) y frente a células Vero. El más alto porcentaje de actividad ictiotóxica (%AI) fue presentada por los extractos butanólico y acuoso de *Miconia caudata* (Bonpl.) DC., *Miconia aeruginosa* Naud., *Miconia* sp., *Clidemia hirta* (L.) D. Don., *Palicourea lyrastipula* Wern L. e *Hirtella racemosa* Lam. En la prueba de citotoxicidad los extractos de *Clidemia hirta* y *Miconia* sp. se presentaron como parcialmente activos; el resto no se mostraron activos frente a células Vero.

Palabras clave—células Vero, citotoxicidad, ictiotoxicidad, *Poecilia reticulata*.

Abstract— Ichthyotoxic and cytotoxic activity were evaluated from ten plants belonging to Chrysobalanaceae, Melastomataceae, Rubiaceae and Rutaceae family. Aqueous and buthanolic extracts were evaluated, which were tested against guppy (*Poecilia reticulata*) fishes and Vero cells. The most high ichthyotoxic activity (%IA) percentage were buthanolic and aqueous extracts of *Miconia caudata* (Bonpl.) DC., *Miconia aeruginosa* Naud., *Miconia* sp., *Clidemia hirta* (L.) D. Don., *Palicourea lyrastipula* Wern L. and *Hirtella racemosa* Lam. In the cytotoxic test the extracts from *Clidemia hirta* and *Miconia* sp. were presented as partially actives, the other showed no activity against Vero cells.

Key Word — cytotoxicity, ichthyotoxicity, *Poecilia reticulata*, Vero cells.

I. INTRODUCCIÓN

La mayoría de sustancias ictiotóxicas a menudo presentan gran variedad de otras actividades biológicas, incluyendo insecticida [1], antitumoral [2] y antiúlceras [3]. Es por esto que una aproximación para encontrar compuestos vegetales con diferentes potenciales son los ensayos de actividad ictiotóxica. Por otro lado siempre es necesario evaluar los posibles daños celulares con el fin de determinar el verdadero potencial terapéutico de extractos vegetales.

Dentro de las actividades reportadas después de haber evaluado la ictiotoxicidad han sido la promoción de tumores por rotenoides, actividad antibacteriana por 5-*O*-metilembelina, efecto promotor de tumores por diésteres de forbol y actividad antitumorígenica por budenina A, actividad antiúlceras por triterpenoides del tipo iridoide [4]. Lo anterior valida al ensayo de ictiotoxicidad como método preliminar utilizado para la búsqueda de nuevas moléculas biológicamente activas [5], no solo con fines en la medicina humana sino también en la agricultura, lo cual promueve estudios farmacológicos que pueden llevar a comprender ciertos mecanismos que aún no están elucidados [6]. Algunos otros compuestos obtenidos de plantas se han reportado como citotóxicos contra algunas líneas de células tumorales [2; 5]

En una de las familias utilizadas en esta investigación, se ha reportado la benzoquinona primina, la cual ha sido aislada de especies del género *Miconia* (melastomataceae) y ha presentado una fuerte actividad antineoplásica en pacientes con carcinoma celular básico, y sarcoma de Kaposi [7].

Dentro de las familias estudiadas en esta investigación, se han identificado compuestos químicos de tipo fenólico, como

flavonoides y polifenoles, terpenos y saponinas [8]. Algunas plantas como *Tephrosia linearis* ha presentado propiedad piscicida y se identificó como compuesto mayoritario la rotenona [9]. Lo mismo ocurre con el extracto etanólico de *Atelesia glazioviana*, que mostró tener las mismas características ya mencionadas; pero sus compuestos mayoritarios son saponinas e isoflavonas (afrormosina y 5-metoxiafrormosina) [10]. Otros trabajos mostraron efecto inhibitorio en la fosforilación mitocondrial por parte de algunos compuestos aislados de plantas, como los polifenoles y flavonoides glicosidados, los cuales intervienen directamente en la cadena respiratoria [11].

Existe gran variedad de compuestos que presentan actividad ictiotóxica y citotóxica, como son polifenoles y flavonoides, entre otros [12]; por lo que el grupo Polifenoles se ha enfocado en la búsqueda de metabolitos secundarios, principalmente del tipo fenólico, y sus actividades biológicas en numerosos extractos de plantas [13; 14].

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Peces de estudio

1. Recolección de los peces guppy

Los peces guppy (*Poecilia reticulata*) se colectaron en uno de los afluentes del río La Vieja, en el municipio de Viterbo, ubicado en el departamento de Caldas (Colombia), mediante el uso de una red en forma artesanal. Esta especie posee gran adaptabilidad al cambio de hábitat y mayor supervivencia que otras especies.

2. Establecimiento y cuidado de los peces

Los peces se mantuvieron por 15 días en pecera de vidrio (Lab de Fitoquímica, Escuela de Química). Para mantener los peces se usó agua pretratada; esta es agua hervida (para eliminación de cloro), aireada y conservada a ± 25 °C. El agua se cambió periódicamente.

B. Material Vegetal

Para los ensayos de actividad citotóxica e ictiotóxica se evaluaron los extractos de 10 plantas de cuatro familias, las cuales se muestran en la siguiente tabla.

Voucher	Familia	Nombre científico
520329	Melastomataceae	<i>Miconia caudata</i> (Bonpl.) DC.
16401	Melastomataceae	<i>Miconia aeruginosa</i> Naud.
520330	Melastomataceae	<i>Miconia</i> sp.
520328	Melastomataceae	<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don
519791	Rubiaceae	<i>Palicourea lyrastipula</i> Wern L.

519789	Rubiaceae	<i>Palicourea angustifolia</i> Kunth
519790	Rubiaceae	<i>Palicourea guianensis</i> Aubl.
519788	Rubiaceae	<i>Hamelia patens</i> Jacq.
	Chrysobalanaceae	<i>Hirtella racemosa</i> Lam.
521530	Rutaceae	<i>Swinglea glutinosa</i>

Tabla 1. Plantas utilizadas en ensayos de citotoxicidad e ictiotoxicidad

1. Obtención de extractos

Se obtuvieron los extractos butanólicos y acuoso a partir de la parte aérea de cada una de las plantas. Un total de 20 extractos fueron obtenidos y evaluados.

C. Ensayo de ictiotoxicidad

Las concentraciones evaluadas para los extractos fueron de 400 mg/L, valor que se encuentra dentro del límite recomendado (inferior a 10,000 mg/L) para los extractos iniciales obtenidos de las plantas [15]. Se disolvieron 40 mg de cada extracto, inicialmente en 0,5 mL de acetona o DMSO, luego se adicionaron a 100 mL de agua pretratada en beaker de 250 mL junto con cinco (5) peces guppy (*Poecilia reticulata*). Se utilizó rotenona como control positivo a una concentración de 0,1 mg/L disuelta en 0,5 mL de acetona o DMSO. El control negativo fue 0,5 mL de acetona o DMSO. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, por un tiempo de exposición de 24 horas. No se proporcionó alimento a los peces durante el ensayo [16-19].

El patrón de comportamiento de los peces, incluye movimientos erráticos, posterior inmovilidad y muerte, fue observado durante las 24 horas del ensayo. Se desarrolló una escala semi-cuantitativa para registrar los porcentajes de actividad ictiotóxica (%A.I.) (ver tabla 2), la cual involucra tanto el número de peces muertos como el tiempo en el cuál ésta ocurre. El valor de %A.I. = 100 fue asignado para el caso que los 5 peces mueran antes de la primera hora de iniciado el ensayo, y un %A.I. = 0, si todos los peces sobreviven después de la 24 horas.

Horas	Número peces muertos					
	0	1	2	3	4	5
1	0,00	20,00	40,00	60,00	80,00	100,00
2	0,00	10,00	20,00	30,00	40,00	50,00
3	0,00	6,67	13,33	20,00	26,67	33,33
4	0,00	5,00	10,00	15,00	20,00	25,00
5	0,00	4,00	8,00	12,00	16,00	20,00
6	0,00	3,33	6,67	10,00	13,33	16,67
7	0,00	2,86	5,71	8,57	11,43	14,29
8	0,00	2,50	5,00	7,50	10,00	12,50
9	0,00	2,22	4,44	6,67	8,89	11,11
10	0,00	2,00	4,00	6,00	8,00	10,00
11	0,00	1,82	3,64	5,45	7,27	9,09
12	0,00	1,67	3,33	5,00	6,67	8,33
13	0,00	1,54	3,08	4,62	6,15	7,69
14	0,00	1,43	2,86	4,29	5,71	7,14
15	0,00	1,33	2,67	4,00	5,33	6,67
16	0,00	1,25	2,50	3,75	5,00	6,25
17	0,00	1,18	2,35	3,53	4,71	5,88

18	0,00	1,11	2,22	3,33	4,44	5,56
19	0,00	1,05	2,11	3,16	4,21	5,26
20	0,00	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00
21	0,00	0,95	1,90	2,86	3,81	4,76
22	0,00	0,91	1,82	2,73	3,64	4,55
23	0,00	0,87	1,74	2,61	3,48	4,35
24	0,00	0,83	1,67	2,50	3,33	4,17
25	0,00	0,80	1,60	2,40	3,20	4,00

Tabla 2. Escala semi-cuantitativa para la determinación de la actividad ictiotóxica.

Los valores se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%A.I. = 20(n \text{ peces muertos})/n \text{ (horas)}$$

De acuerdo a los %A.I. obtenidos se tuvo en cuenta el siguiente criterio de selección de las muestras como activas (A), parcialmente activas (PA) y no activas (NA). Una muestra activa, es aquella que en un periodo inferior a 7 horas, ha matado 5 peces, con un %A.I. superior al 14,29%. Una muestra parcialmente activa, es aquella que mata los 5 peces en un periodo igual o superior a 7 horas, con un %A.I. igual o inferior al 14,29%, y una muestra no activa es cuando no hay muertes durante las 24 horas del bioensayo.

D. Ensayo de citotoxicidad

Las pruebas de citotoxicidad con células Vero fueron realizadas en microplacas de 96 pozos y tratadas con los extractos obtenidos (0-300 mg/mL) durante 72 horas a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% mezcla de aire. La viabilidad celular se determinó utilizando el método colorimétrico MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro. El porcentaje de citotoxicidad (%A.C.) se calculó mediante la ecuación:

$$\%A.C. = ((OD_{control} - OD_{tratado})/OD_{control}) * 100$$

La actividad de las células de mamíferos se expresó en concentración citotóxica (CC₅₀ y CC₉₀). Los datos se calcularon utilizando el software (Mxflfit; GO Business Solution, Guildford, UK).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Actividad ictiotóxica

En la siguiente tabla se muestran 8 extractos activos, 6 parcialmente activos, y 2 se clasificaron como no activos. Entre los extractos no activos se tienen los tres extractos evaluados de *P. angustifolia* y *P. guianensis*, ambas pertenecientes a la familia Rutaceae.

Planta	Extracto acuoso	Extracto BuOH
<i>M. caudata</i>	50,00%(A)	14,29%(PA)
<i>M. aeruginosa</i>	12,50%(PA)	4,35%(PA)

<i>M. sp</i>	33,33%(A)	25,00%(A)
<i>C. hirta</i>	50,00%(A)	16,67%(A)
<i>P. lyrastipula</i>	33,33%(A)	4,17%(PA)
<i>H. patens</i>	7,14%(PA)	0,0%(NA)
<i>H. racemosa</i>	50,00%(A)	50,00%(A)
<i>S. glutinosa</i>	14,29%(PA)	0,0%(NA)

Tabla 3. Actividad ictiotóxica de extractos acuosos y butanólico de diferentes plantas

Se utilizaron como controles la acetona y el DMSO los cuales no producen ningún tipo de cambio en el comportamiento de los peces, durante las 24 horas del ensayo.

La posición de los peces muertos, después de adicionada la rotenona, fue de forma horizontal. La causa de la muerte de los peces puede explicarse debido a que la rotenona posee un efecto de inhibición de enzimas encontradas en la cadena transportadora de electrones del ciclo respiratorio. Siendo muy efectivo en el control de insectos y animales acuáticos [20].

Las plantas promisorias de los extractos butanólicos fueron *Miconia caudata*, *Miconia aeruginosa*, *Miconia sp.*, *Clidemia hirta*, *Palicourea lyrastipula* e *Hirtella racemosa*.

De los extractos acuosos, todas las plantas mostraron tener actividad ictiotóxica promisorias.

Los resultados mostraron que 4 de 10 plantas estudiadas 3 Melastomataceae (*Clidemia hirta* (L.) D. Don., *Miconia caudata* (Bonpl.) D.C., *Miconia sp.* y una Chrysobalanaceae (*Hirtella racemosa* Lam.), son promisorias al presentar los porcentajes de muerte más elevados, lo que las hace una buena elección, para realizar un fraccionamiento bioguiado completo, tanto en su extracto butanólico como acuoso.

La observación durante 24 horas mostró movimiento errático, sacudidas bruscas, inmovilidad y mortalidad a un tiempo determinado de aplicación de los extractos. En contraste con el blanco donde los peces se mantuvieron con movimientos lentos a lo largo del ensayo.

Las plantas con mayor porcentaje de actividad ictiotóxica pueden ser posibles piscicidas, ayudando al aumento de captura de peces o la eliminación de ciertos peces no deseados en áreas ribereñas de transporte fluvial [21].

B. Actividad citotóxica

En este ensayo se consideran extractos activos aquellos que presenten un IC₅₀ <50 µg/mL y un IC₉₀ <100 µg/mL, como parcialmente activos un IC₅₀ <50 µg/mL y un IC₉₀ >100 µg/mL y no activos los que presenten un IC₅₀ >50 µg/mL y un IC₉₀ >100 µg/mL. Para este ensayo se utilizó Nifurtimox como control. Los resultados obtenidos se exponen en la siguiente tabla.

Plantas	µg/mL		
	CC ₅₀	DEV	CC ₉₀
<i>M. caudata</i>	>300		>300
<i>M. aeruginosa</i>	234,50	26,54	>300
<i>M. sp</i>	40,40	3,56	>300
<i>C. hirta</i>	45,28	7,92	>300
<i>P. lyrastipula</i>	73,72	15,67	>300
<i>H. patens</i>	45,35	5,29	>300
<i>H. racemosa</i>	252,42	23,42	>300
<i>S. glutinosa</i>	121,90	9,24	>300

Tabla 4. Actividad citotóxica de extractos de plantas frente a células Vero. DEV: desviación estándar

Según los resultados mostrados en la tabla 4, ninguno de los extractos fue activo frente a las células Vero. Los extractos evaluados de *Miconia* sp., *Clidemia hirta* y *Hamelia patens*, se presentaron como parcialmente activos. El resto de los extractos se reportan como no activos.

Estos resultados muestran una tendencia baja en toxicidad frente a células Vero, lo que hace que estos extractos se presenten como fitoterapéuticos promisorios.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La actividad ictiotóxica mostrada por las especies de plantas *M. caudata*, *C. hirta* y *H. racemosa* son las más promisorias para futuros ensayos bioguiados.

Todos los extractos exceptuando los de *Miconia* sp., *Clidemia hirta* y *Hamelia patens* no presentan efectos citotóxicos a nivel de células Vero, lo cual es un indicativo de su potencial terapéutico.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia Escobar de la Universidad Industrial de Santander por su apoyo en la realización de las pruebas de citotoxicidad.

REFERENCIAS

- [1] Fukami, H., Nakajima, M. Naturally Occurring Insecticides. New York: Jacobson and Crosby, 1971.
- [2] Bhargava, U.C., Westfall, B.A. 1968. Antitumor Activity of *Juglans nigra* (black walnut) Extractives. J. Pharm. Sci, **57**(10):1674-77.
- [3] Miyake, Y., Ito, H., Yoshida, T. 1997. Identification Iridals as Piscicidal Component of Iridaceous Plants and their Conformation Associated with CD Spectra. Can. J. Chem, **75**(6):734-741.
- [4] Ito, H., Muranaka, T., Mori, K., Jin, Z-X., Tokuda, H., Nishino, H., Yoshida, T. 2000. Ichthyotoxic Phloroglucinol Derivates from *Driopteris fragans* and their Anti-tumor Promoting Activity. Chem Pharm Bull, **48**(8):1190-1195.
- [5] Yoshida, T., Ito, H. 2000. Naturally Occurring Ichthyotoxic Substances and their Biological Activities. Current Topics in Phytochemistry, **4**:135-145.
- [6] McFerren, M.A., Rodriguez, E. 1998. Piscicidal Properties of Piperovatine from *Piper piscatorum* (Piperaceae). Journal of Ethnopharmacology, **60**:183-187.
- [7] Melo, A.M., Jardim, M.L., De Santana, C.F., Lacet, Y., Lobo Filho, J., De Lima e Ivan Leoncio, O.G. 1974. First Observation On the Topical Use of Primin, Plumbaging and Maytenin in Patients with Skin Cancer. Rev. Inst. Antibiot, **14**(1-2):9-16.
- [8] Lopera, I., Bedoya, C.D. 2009. Actividad Ictiotóxica de Extractos Polares y Apolares de Algunas Especies de los Géneros *Miconia*, *Clidemia* (Melastomataceae) y *Palicourea*, *Hamelia* (Rubiaceae). Trabajo de Grado. Universidad Tecnológica de Pereira.
- [9] Were, O., Munava, R.H., Lwande, W., Nyandat, E. 1990. Flavonoids from *Tephrosia interrupta* and *T. linearis*. Fitoterapia, **61**(1):372.
- [10] Bhatt, J.P. 1991. Neurolytic Manifestation of Piscicidal Flavanoid of Plant, *Engelhardtia colebrookiana* (Lindley) in Fish. Indian J. Exp. Biol, **29**: 588-590.
- [11] Riet-Correa, G.L. 2002. Susceptibilidade de Animais de Laboratório à into Intoxicação por *Ateleia glaziouviana* (Leg. Papilionoideae). Pesq. Vet. Bras. **22**(2):73-78.
- [12] Harborne, B.J. 1975. The Flavonoids. Ed. Chapman and Hall. London. 1024-1026.
- [13] Quiñones M., L.M. Diversidad de la Familia Melastomataceae en la Orinoquía Colombiana. 2001. p-125.
- [14] Renner, S.S. 1990. Revision of *Rychanthera* (Melastomataceae). Nordic Journal Bototany, **9**:601- 630.
- [15] CYTED. 1995. Manual de Técnicas de Investigación. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
- [16] Ismail, I.S., Ito, H., Mukainara, T., Higashihara, H., Enjo, F., Tokuda, H., Nishino, H., Yoshida, T. 2003. Ichthyotoxic and Anticarcinogenic Effects of Triterpenoids from

Sandoricum koetjape Bark. Biol. Pharm. Bull, **26**(9):1351-1353.

- [17] Jiménez González, F.J., Calle Chaúrra, L.M. 2002. Actividad Ictiotóxica, Antibacterial y Antifúngica de Polifenoles del Extracto en Acetato de Etilo *Miconia coronata*. Trabajo de Grado. Universidad Tecnológica de Pereira.
- [18] Gouveia, J.A. 2006. Comportamento de Peixes: Vantagens e Utilidades nas Neurociências. Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE) - Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC).
- [19] Ribas, A.M. 2006. Comparative Study of in Vitro Cell Based Assays Versus in Vivo Toxicity Tests to Monitor Environmental Hazard of Pesticides. Laboratorio de Toxicología Ambiental. Universitat Politècnica De Catalunya.
- [20] Bhatt, J.P. 1992. Neurodepressive Action of a Piscidal Glycoside of Plant, *Aesculus indica* (Colebr.) in Fish. Indian J. Exp. Biol, **30**:437-439.
- [21] Burkholder, J.M., Marshall, H.G. 2012. Toxigenic *Pfiesteria* species – Update On Biology, Ecology, Toxins, and Impacts. Harmful Algae, 14:196-230