

# BIOENSAYO GENERAL DE LETALIDAD EN Artemia salina, A LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE Psidium guajava. L y Psidium guineense. Sw

## RESUMEN

El estudio se centró en la evaluación y verificación de la letalidad de las fracciones acetato de etilo, obtenida de los extractos etanólicos de los frutos en estado de madurez, verde y pintón, utilizando la cáscara y pulpa de las especies guayaba (*Psidium guajava* L) y Choba (*Psidium guineense* Sw). La valoración se llevó a cabo mediante el bioensayo en *Artemia salina*, a través del cual, se evidencia el siguiente proceso: determinar la concentración letal 50 (CL50) utilizando el medio artificial a Ph 7-8, burbujear con el fin de saturar de oxígeno la solución, controlar la eclosión de los huevos a 25 °C después de 48 horas, preparar la solución madre y las de trabajo a concentraciones de 1500, 1000, 500, 100, 10 g/ml, control positivo estricnina a 80, 70, 60, 50 g/ml, blanco solvente etanol a 80 g/ml. El ensayo biológico se realizó siguiendo las metodologías propuestas por Gualdrón, R (1994); Cyted (1995); Martínez, C (1999) y McLaughlin, J (1997). Comprobada la letalidad de las fracciones acetato del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. Sw mostró CL50 de 181.4 y 221.30 g/ml respectivamente, los resultados se evaluaron según Gautret (2000).

Palabras Clave: Extractos vegetales, fracciones, letalidad, artemia salina.

Por: SÁNCHEZ, Lizbeth\*.  
NEIRA, Adriana\*\*.

\* Química de alimentos UPTC, coinvestigadora Instituto de Investigaciones Científicas-Inicien. JDC. E-mail: lizsapi\_n\_7@hotmail.com

\*\* Química de alimentos y joven investigadora UPTC. E-mail: aneiragonzalez@yahoo.es

# Introducción

Uno de los biomodelos más utilizados en las etapas preliminares de la investigación fitoquímica, es el bioensayo de letalidad frente a *Artemia Salina*<sup>1</sup>. (figura 1), desarrollada en 1982 por Meyer y Col. El procedimiento consiste en exponer compuestos activos y/o extractos de plantas a nauplios de *Artemia salina*, para determinar valores de concentración letal 50 (CL50), expresada en g/ml. (Martínez, 1999). Sin embargo, los valores obtenidos de CL50, no advierten una actividad fisiológica o biológica en particular; son indicadores de toxicidad a nivel celular que pueden orientar investigaciones más específicas.

Figura 1. *Artemia salina*



(Fuente: <http> 1)

La toxicidad in vivo de un organismo animal puede usarse como método conveniente para el seguimiento y fraccionamiento en la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos; por tal razón, en este trabajo se decidió realizar el bioensayo de letalidad sobre nauplios de *Artemia salina*. Este organismo es fácil de cultivar y manipular en laboratorio, es sensible a una gran variedad de tóxicos; y genera resultados

<sup>1</sup> Pertenece a la clase de los crustáceos, presenta un cuerpo de aspecto variable, segmentado, delgado; su longitud oscila entre 10-12 mm y la variabilidad depende según el tipo de especie y de las características del medio donde habitan, especialmente la salinidad. (Gualdrón, 1994). Habita en aguas saladas y zonas salubres. Se desplaza velozmente sobre su dorso por el agua y constituye una parte fundamental dentro de la cadena alimenticia en los ecosistemas donde vive. (Forero, 2002)

## ABSTRACT

The study was centred in the evaluation and verification of the lethality of the ethyl acetate fractions, obtained out of the ethanolic extracts of mature, rape, and semi mature fruits, using the shell and the pulp of the species guava (*Psidium guajava* L) and Choba (*Psidium guineense* Sw). The valuation was carried out by means of the bioassay in *Artemia salina*, through which the following process is evidenced: to determine the Lethal concentration 50 (CL50) using the artificial environment to Ph 7 - 8, to bubble in order to saturate the solution with oxygen, to control the eggs appearance to 25 °C after 48 hours, to prepare the mother and working solution at concentrations of 1500, 1000, 500, 100, 10 mg/ml, strychnine positive control at 80, 70, 60, 50 mg/ml, ethanol solvent target to 80 mg/ml. The biological rehearsal was carried out following the methodologies proposed by Gualdrón, R (1994); Cytel (1995); Martínez, C (1999) and McLaughlin, J(1997). Proven the lethality of the acetate fractions of the ethanolic extract of *Psidium guajava* L and *Psidium guineense* Sw it showed CL50 181.4 and 221.30 mg/ml respectively, the results were evaluated according to Gautret (2000).

Key words: Vegetable Extracts, Fractions, Letalidad, *Artemia salina*.

confiables en cuanto alternativa poco costosa, sencilla y rápida. Puede ser usada de manera rutinaria en la investigación fitoquímica y permite crear una base para adelantar posteriores estudios, que brinden aplicaciones (Forero, 2002).

Este bioensayo es aplicable a compuestos con estructuras y modos de actividad diversos, lo que le otorga la característica de ser de amplio espectro, de ahí que sea usado como método de análisis para detectar residuos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos y compuestos de tipo morfínico entre otros (Gualdrón, 1994).

Las muestras analizadas pertenecen a la familia de las Mirtáceas, *Psidium guajava* L (figura 2), se cultiva y produce en la región de Moniquirá y municipios aledaños del departamento de Boyacá, (Cañón, 2000); es originaria de América tropical. Los principales productores son India, Brasil, México y Cuba, entre otros. En Colombia su cultivo se encuentra ampliamente propagado en Boyacá, Santander, Cesar y Atlántico. La producción requiere una precipitación óptima de 1.000-3.800 mm de lluvia anual y una temperatura de 15,5-34°C. (Gupta, 1995); se ha utilizado tradicionalmente como planta medicinal: antidiarreico, antiséptico, astringente y digestivo, contra padecimientos de la piel, la diabetes, el catarro y la tos (Martínez, 1997).

**Figura 2.** *Psidium guajava* L “Guayaba”



*Psidium guineense* Sw (figura 3), se da en la región de bajo Ricaute (Ráquira, Villa de Leiva). Es una planta nativa y de amplia dispersión en América tropical hasta 2200msnm, prospera en terrenos áridos, es un arbolito de 2 a 2.5 metros de altura, los frutos son globosos, a veces ovoides, aromáticos, pedunculados (Romero, 1991). Es usada como planta medicinal, la decocción de las raíces es ideal para tratar enfermedades urinarias, diarrea y disentería. En Costa Rica se emplea para reducir venas varicosas y úlceras en las piernas. La decocción de la hoja es empleada para curar la bronquitis. (Chavarría, 1998)

**Figura 3.** *Psidium guineense* Sw “Choba”.



(Fuente: http 2)

## Materiales y métodos

El bioensayo, se llevó a cabo en el laboratorio de ensayos farmacológicos del grupo de investigación “Búsqueda de principios bioactivos en plantas medicinales” Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.

La evaluación se practicó a frutos frescos y sanos en estado de madurez verde y pintón, utilizando la cáscara y la pulpa (Tabla 1), donde se determinó la madurez por pH y acidez. En condiciones secas, unas muestras fueron sometidas a extracción por maceración en frío y otras por precolación con etanol a 96%, y concentrados en rotaevaporador BÜCHI R205 hasta la sequedad. Finalmente, se fraccionó con acetato de etilo a cuyas partes se les realizó el ensayo de letalidad con *Artemia salina*.

	SIGLA	MUESTRA	FRACCIÓN ACETATO DE ETILO
Guayaba fruto cáscara pintona seca	GFCPS	M2	M2FA
Guayaba fruto pulpa pintona seca	GFPPS	M4	M4FA
Choba fruto cáscara verde seca	ChFCVS	M6	M6FA
Choba fruto cáscara pintona seca	ChFCPS	M7	M7FA
Choba fruto pulpa verde seca	ChFPVS	M8	M8FA

Las muestras evaluadas de las especies *Psidium guajava* L (guayaba), variedad roja regional y *Psidium guineense* Sw, (choba) silvestre, fueron clasificadas en el Herbario Nacional Colombiano.

Una vez preparado el medio artificial para el cultivo de *artemia salina*, se verificó que la medida del pH estuviera entre 7 y 8. Se sometió a burbujeo con una bomba de oxígeno por una hora, con el fin de saturar de este ele-

mento la solución. Se adecuó un recipiente que hiciera las veces de cámara de incubación para el desarrollo (eclosión) de 45 mg de huevos de Artemia salina, en 450 ml de medio artificial. Ésta consta de una zona oscura y una zona iluminada permanentemente. Como fuente de luz se colocaron dos lámparas redondas con bombillas de 110 vatios a 40 cm de distancia de las cámaras. Encendidas desde el momento de cultivo hasta la culminación de cada bioensayo, permitieron mantener una temperatura de 25 °C. A las 24 horas se observó la eclosión de los nauplios, los cuales se dejaron madurar durante 48 horas, tiempo establecido para la utilización en el bioensayo.

Para la preparación de las muestras madre, se pesaron 60mg de cada fracción y se llevó a un volumen de 6 ml con medio artificial. A partir de ésta, se prepararon soluciones a concentraciones de 1500, 1000, 500, 100 y 10 g/ml. Luego se dispuso la solución madre a partir de estricnina de 40 mg, la cual se disolvió con 6ml de etanol, quedando a una concentración de 6.6 mg/ml. Con ésta se elaboraron mezclas de 80, 70, 60 y 50 µg/ml.

Así mismo, se hicieron dos blancos; uno como disolvente de las fracciones (agua) y el otro de estricnina (etanol). Para el primero se tomaron 750l de agua destilada y para el segundo 60µl de etanol. Este último alcanzó una concentración de 80 mg/ml.

En todas las muestras y blancos se completó un volumen de 5 ml con medio artificial, las cuales contenían 10 nauplios con 48 horas de haber eclosionado. Para analizar los resultados se realizaron tres réplicas.

Los tubos preparados fueron mantenidos a 25 °C y expuestos a la luz durante 24 horas, en gradillas.

Durante el bioensayo se registra el número de nauplios puestos inicialmente en cada tubo de ensayo (TV); al cabo de 24 horas de contacto con las sustancias y los extractos ensayados se realizó el conteo del número de nauplios muertos (TM).

Se calculó el porcentaje de letalidad por cada una de las concentraciones determinadas mediante la ecuación: %Letalidad = TM/ TV x 100, calculándose la CL<sub>50</sub> por la siguiente ecuación:

Finalmente, se clasificaron las fracciones y patrones o blancos evaluados según la toxicidad, tomando como referencia las recomendaciones del CYTED<sup>2</sup> (Tabla 2).

**Tabla 2.** Clasificación toxicidad según CYTED

I	Extremadamente tóxico	1-10	µg/ml
II	Altamente tóxico	10-100	µg/ml
III	Moderadamente tóxico	100-500	µg/ml
IV	Ligeramente tóxico	500-1000	µg/ml
V	Prácticamente no tóxico	1000-1500	µg/ml
VI	Relativamente inocuo	> 1500	µg/ml

## Resultados y discusión

### Preparación de las muestras:

Las muestras evaluadas fueron las especies Psidium guajava L (guayaba), variedad roja regional y Psidium guineense Sw, (choba) silvestre, identificadas por el Herbario Nacional Colombiano, con número de colección 498195 y 495197 respectivamente.

La tabla número 3 muestra resultados promisorios del ensayo de letalidad en Artemia salina, aplicado a las fracciones de acetato, en lo que se refiere a actividad biológica preliminar; ya que se encontraron valores de CL<sub>50</sub> de 181.4 y 221.30 µg/ml, y puede clasificarse como moderadamente tóxico (entre 500-100 g/ ml), según el Cyted, la CL<sub>50</sub> es la concentración que inhibe el 50% de la población. (Rodríguez, 1999).

$$\text{Log CL}_{50} = \log X_1 + \frac{50 - Y_1}{Y_2 - Y_1} [(\log X_2) - \log (X_1)]$$

X<sub>1</sub> → Concentración inhibición Y<sub>1</sub> > 50 %

X<sub>2</sub> → Concentración inhibición Y<sub>2</sub> < 50 %

<sup>2</sup>CYTED: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.

**Tabla 3.** Resultados del Bioensayo en Artemia Salina

MUESTRA	[ c ] μG/ML	MUERTOS	VIVOS	LETALIDAD	CATEGORÍA	CL <sub>50</sub> μg/ml
<b>M2FA</b>	1500	10	0	100 %		<b>181.4</b>
	1000	10	0	100%		
	500	10	0	100%	Moderadamente tóxico	
	100	1	9	10 %	Moderadamente tóxico	
	10	0	10	0%		
<b>M4FA</b>	1500	10	0	100%		<b>221.30</b>
	1000	10	0	100%		
	500	10	0	100%	Moderadamente tóxico	
	100	0	10	0%	Moderadamente tóxico	
	10	0	10	0%		
<b>M6FA</b>	1500	10	0	100 %		<b>181.4</b>
	1000	10	0	100%		
	500	10	0	100%	Moderadamente tóxico	
	100	1	9	10%	Moderadamente tóxico	
	10	0	10	0%		
<b>M7FA</b>	1500	10	0	100%		<b>221.30</b>
	1000	10	0	100%		
	500	10	0	100%	Moderadamente tóxico	
	100	0	10	0%	Moderadamente tóxico	
	10	0	10	0%		
<b>M8FA</b>	1500	10	0	100%		<b>221.30</b>
	1000	10	0	100%		
	500	10	0	100%	Moderadamente tóxico	
	100	0	10	0%	Moderadamente tóxico	
	10	0	10	0%		
<b>BLANCO</b>	1500	0	10	0		

## PATRÓN ESTRICNINA

[ c ] μG/ML	MUERTOS	VIVOS	LETALIDAD	CATEGORÍA	cl <sub>50</sub> μG/ML EXPERIMENTAL	cl <sub>50</sub> μG/ML LITERATURA
80	6	4	60%	Altamente tóxico	50	77.2
70	6	4	60%	Altamente tóxico		
60	6	4	60%	Altamente tóxico		
50	5	5	50%	Altamente tóxico		
<b>PATRÓN ETANOL (Solvente de la Estricnina)</b>						
80	1	9	10%			

De acuerdo con estos resultados se puede decir que todas las muestras evaluadas manifestaron toxicidad frente a la *Artemia salina*. Además, la actividad de las sustancias evaluadas se comparó con el patrón Estricnina que presentó un CL<sub>50</sub> de 50g/ml, donde se observa que este organismo es muy sensible a los principios activos presentes en estas muestras. Esto justifica la conveniencia del ensayo en los estudios preliminares de la actividad de las fracciones en función de la toxicidad de los mismos, destacándose el carácter reproductivo del ensayo, ya que se presenta una diferencia mínima entre los valores experimentales del patrón y los reportados en la literatura.

## Conclusiones

- La concentración letal 50 de las fracciones acetato de etilo presenta valores de 181.4 y 221.30 g/ml considerando que está relacionado como moderadamente tóxico.
- El valor de CL<sub>50</sub>, producto del bioensayo, no muestra una actividad fisiológica o biológica en particular; es indicador de toxicidad a nivel celular, que puede orientar investigaciones específicas futuras, en busca de nuevos productos naturales bioactivos con los frutos empleados. ■

## BIBLIOGRAFÍA

- CAÑÓN, P.D. (2000). Desarrollo de manejo poscosecha de guayaba (*Psidium guajava* L) apropiado a las condiciones del río Suárez. Tesis de grado, Universidad de Ciencias Aplicadas Ambientales.
- CHAVARRÍA, F; MASÍS, A.; ESPINOZA, R; GUADAMUZ, A; Y PEREZ, D. (1998). *Species de Psidium guineense* (Mytaceae). 26 Septiembre 1998. Species Home Pages. Area de Conservación Guanacaste. Costa Rica.
- DEHARO, E; GAUTRET, Ph; MUÑOZ, V; y SAUVAIN, M. (2000). Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas: Cytel. p.p 72-73.
- FORERO, G.A. (2002). Estudio Fitoquímico del extracto etanólico de la madera de "Virola carinata" (Myristicaceae). Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.
- GUALDRON, V. R y LOPEZ, P. S. (1994). Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre larvas de *Artemia Salina* de algunas plantas superiores colombianas. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.
- GUPTA, M. (1995). 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. (Colombia: Convenio Andrés Bello, CYTED), p.p. 413-418. Santa fe de Bogotá.
- MARTINEZ, C y BELTRAN, M. (1999). Estudio Fitotóxico Preliminar de diez especies vegetales utilizadas en medicina natural. Tesis (Químico Farmacéutico). Universidad nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.
- MARTÍNEZ, M; MOLINA, N y BOUCOURT, E. (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Psidium guajava* L. (guayaba). Rev. Cubana de Plantas Medicinales. 2(1): 12-14.
- MCLAUGHLIN, J.L. (1997). The use of biological assays to evaluate botanicals, submitted to drug inform. p.p. 1-14
- PINZON, R y SÁNCHEZ, C. (1995). Manual de Técnicas de Investigación: CYTED. p.p 63-70.
- ROMERO, C. (1991). Flores silvestres de Colombia: Instituto Colombiano de Cultura Hispánica. En: Mirador del Sabio Mutis. p.p. 505-510.
- RODRIGUEZ, A. (1999). Contribución al estudio fitoquímico y bioactividad en *Artemia salina* de la madera *Guarea Kunthiana* (Meliaceae). Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia.
- RODRÍGUEZ, E; GUTIÉRREZ, y QUINTERO, R. (1997). Estudio farmacognóstico y valoración del extracto fluido obtenido de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba). En: Rev. Cubana Plant Med; 2(2-3):26-9.

1. <http://www.bioética.org/>
2. <http://www.acguanacaste.ac.cr>