

Rocío Lesme, Rosa Vega, Tomás López
Facultad de Química
Universidad del Norte
Rev UN Med 2015 4(1): 127-142

Evaluación de la toxicidad aguda de un extracto acuoso de *Moringa oleifera* mediante el bioensayo en *Daphnia magna*

RESUMEN

En los últimos años, la *Moringa oleifera* (MO) se ha convertido en una de las hierbas de consumo habitual en nuestra sociedad. Debido a las múltiples propiedades que le son asignadas, se la emplea con fines terapéuticos, como forraje e incluso como una eficiente purificadora del agua. Con el fin de evaluar la toxicidad aguda de un extracto acuoso de *M. oleifera* (EAMO), fue llevado a cabo el bioensayo con crustáceos de *Daphnia magna*. Los resultados obtenidos demostraron que el extracto mencionado es de escasa toxicidad.

Palabras claves: moringa oleifera, daphnia magna, ensayo toxicológico.

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales obtenidos de las plantas proporcionan una valiosa fuente de nuevas drogas y compuestos potencialmente farmacéuticos, como el caso de la MO. Diversas propiedades benéficas le son atribuidas, lo cual está vinculado a la capacidad hipoglucemiante, antifúngica (Leone), antibacteriana, antioxidante (Ndhlala), entre otras. La parte más utilizada de la planta son las hojas, debido a la presencia significativa de componentes bioactivos (Guzmán-Maldonado, Leone). Por ello, la manera de consumirla habitualmente es mediante la preparación de infusiones (Michel). Si bien, la MO posee una amplia variedad de nutrientes; es necesario esclarecer que tanto los efectos adversos como secundarios a las sustancias vegetales son habituales (Relevant, Aspects, y Damages). En este punto, los ensayos biológicos desempeñan un papel fundamental como herramienta de diagnóstico.

Un bioensayo utiliza tejido vivo, organismo o grupo de organismos, como reactivo para evaluar los efectos de cualquier sustancia fisiológicamente activa, bajo condiciones experimentales específicas y controladas (Núñez y Hurtado). Es una prueba relativamente rápida, proporcionando datos en un periodo de 48 horas. A partir de tal información es posible determinar la concentración efectiva media (CE50). Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), se define como la concentración derivada de un tóxico que causará un efecto no letal determinado en 50% de una

población dada de organismos bajo condiciones específicas.

Uno de los organismos habitualmente utilizados en bioensayos acuáticos es la *Daphnia magna*, genéricamente llamada pulga de agua. La misma es utilizada por parte del ser humano como indicador natural de la contaminación del medio ambiente (bioindicador), debido a la particularidad de las pulgas de poder vivir meramente bajo rigurosas condiciones y ser altamente sensibles en comparación a otros microorganismos (Teodorovic). El bioensayo de toxicidad es una herramienta indispensable en lo que se refiere a la ecotoxicología empleado en el monitoreo ambiental (Medeiros, Cantú). Asimismo, es apto como punto de referencia para realizar pruebas preclínicas de productos naturales que se ofrecen en el comercio y determinar la capacidad tóxica de fitoquímicos definidos, entre otras posibles utilidades. Aportes reiteran que, aunque la medicina natural constituye una alternativa accesible para aquellos individuos que carecen de recursos suficientes para adquirir medicamentos o simplemente prefieren las infusiones a las pastillas; no hay sustancia totalmente inocua por más natural que sea (Ferreira, Awodele, Ambi).

Tal afirmación nos conduce a la realización del siguiente trabajo, ya que el empleo de MO con fines terapéuticos se encuentra cada vez más establecido en nuestra sociedad. De este modo, se hace imperante estudiar el grado de toxicidad que la misma posee, y así, poder considerarla como una alternativa segura

para acompañar el tratamiento de diversas enfermedades (Bakre, Aderibigbe, y Ademowo).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección de la Planta

Las muestras de la especie vegetal en estudio procedieron de la Granja Kala Huala, Departamento de San Pedro, Paraguay. Fue realizada la identificación botánica, cuyo material testigo se encuentra depositado en el Herbario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN).

Preparación de la Planta

El proceso fue llevado a cabo con la parte aérea de la planta (hojas), en óptimo estado de desarrollo vegetativo y fitosanitario. Tales hojas son secadas a la sombra, con ventilación forzada utilizando una estufa con temperatura menor a 43° C y aproximadamente 10% de humedad; para posteriormente ser pulverizadas mediante molienda tradicional. El producto obtenido es envasado en recipientes herméticos y almacenado en un área de sombra, libre de humedad.

Obtención del Extracto

La preparación del EAMO fue realizada según lo indicado por Castillo, con ciertas modificaciones. Fueron pesadas cantidades exactas (10g) de hojas molidas, en balanza analítica de 0.001g de precisión. A dichas hojas se les agrega un volumen aproximado de 250ml de agua mineral, para luego hervir todo esto por un lapso de 10 minutos a temperatura de laboratorio (21°C ± 2). Dejar enfriar a 40-45°C. El filtrado del extracto fue realizado utilizando papel de filtro cualitativo N° 2. El extracto fue trasvasado a un matraz de doble aforo de 100 ml de capacidad, completando el volumen requerido y así obtener una solución al 10%. Se conservó en un refrigerador a 4°C por 12h.

Daphnia magna

Los individuos utilizados para los bioensayos fueron mantenidos en cultivos discontinuos a base de agua dura reconstituida (Federation); en recipientes de 5 litros, con una densidad de 12 hembras adultas/litro, alimentadas con la microalga *Chlorella* sp. Dicha microalga, a su vez, se mantiene en medio de cultivo Bristol (Kessler E), con fotoperiodo similar al de *D. magna*. La alimentación es realizada de forma diaria, con una concentración de $1,5 \times 10^6$ células de *Chlorella* × *Daphnia*/día. Las condiciones de mantenimiento para *D. magna* y *Chlorella* sp. son de un fotoperiodo de luz/oscuridad de 16/8 horas, oscuridad, el nivel de iluminación se mantuvo en 1000 lux, la temperatura de 20 °C, ph 7-8, y una dureza de 160-180 mg CaCO₃/L.

Estudio de Toxicidad Aguda

La toxicidad aguda de la sustancia fue determinada mediante la inhibición de la movilidad del crustáceo *D. magna*, tras 24 y 48 horas de exposición; según el procedimiento establecido por la OECD 202. Se prepararon diluciones de la muestra de un EAMO al 10% en agua dura reconstituida. La mayor concentración debería mostrar 100% de inmovilidad, y la menor ningún efecto observable.

Para establecer la relación dosis-efecto, se evaluaron las siguientes concentraciones (v/v): 10%, 7%, 5%, 2.5 %, 1.25%, y 0.625%. Se emplearon tres réplicas por cada concentración (para una correcta calibración intra laboratorio, deben realizarse un número mínimo de 5 bioensayos de toxicidad triplicados consecutivos), en vasos de plástico de 30 ml de capacidad (Figura 2); cada uno con diez crustáceos de *D. magna* menores a 24 horas de edad. Cada vaso con un volumen aproximado de 20 ml de la disolución; puesto que debe proveerse, como mínimo, 2 ml de la misma a cada animal. Se utilizó dicromato de potasio a 2 mg/L como sustancia de referencia (control positivo) para la evaluación de la sensibilidad de los crustáceos.

Análisis Estadístico

Para la determinación de la CE50 fue utilizado el método log-Probit, definido mediante el software estadístico SPSS 15.0 a un nivel de significancia de 0.05.

DISCUSIÓN

El uso de animales invertebrados para la determinación preliminar de la toxicidad de extractos provenientes de fuentes naturales ofrece una reducción significativa del costo, tiempo y espacio requerido para la experimentación; sumamente provechoso, debido a que en varios casos existe una correlación significativa entre las pruebas toxicológicas en invertebrados y en mamíferos (Aoki). El tipo de reproducción de la *D. magna* es una de las razones por la cual es tan utilizada como bioindicador ambiental (presentando una fase sexual y otra asexual). Al encontrar condiciones favorables, mantiene la fase asexual conocida como partenogénesis, lo que permite trabajar con poblaciones genéticamente uniformes (Núñez).

El amplio consumo humano de MO como parte de la dieta y de remedios terapéuticos durante siglos, sin que se reporten casos de alergias y toxicidad, podría parecer un aval suficiente de su inocuidad (Martín). Los resultados del trabajo realizado por la ACSA (2010), indican un efecto tóxico por parte del macerado de flores de MO para las abejas *Apis mellifera* africanizadas. Vale destacar que el néctar pro-

ducido por dichas flores, que repele o causa toxicidad a una especie, puede no afectar a otra. Hallazgos determinaron que el extracto acuoso de las semillas de MO presenta sustancias con capacidad larvicida para *Aedes aegypti* y un potencial tóxico moderado para animales de laboratorio (Ferreira).

Pruebas orales de toxicidad en ratas de laboratorio revelaron que la semilla de MO presenta un nivel de baja toxicidad sin llegar a ser dañino, según la dosis administrada y en periodos de exposición cortos (Salgar); así como un posible efecto mínimo sobre los parámetros sanguíneos. Por su parte, una investigación sobre el tratamiento con hojas de MO concluyó que dicha planta protege significativamente ante los efectos de la toxicidad inducida por arsénico.

CONCLUSIÓN

Los resultados encontrados indican que el EAMO puede considerarse de escasa toxicidad, según la clasificación de toxicidad aguda propuesta por Zucker (1985) (Ferreira) para invertebrados acuáticos. Los extractos producidos en base a diversas partes de la MO presentan elevados márgenes de seguridad; hecho científico respaldado por evidencia empírica. La toxicidad de la MO sobre ciertas bacterias, hongos u otro tipo de organismos potencialmente dañinos ha sido registrada, lo cual refuerza la necesidad de continuar estudiándola; de modo a verificar sus beneficios para considerar una posible aplicabilidad a nivel terapéutico.

TRABAJOS CITADOS

- Alternativa, UNA, y DE Producción Comercial. "Plantas medicinales y aromáticas." (2010). Internet.
- Ambi, Aminu A et al. "Toxicity Evaluation of Moringa Oleifera Leaves." 4.3317 (2011): 22–24. Impreso.
- Aoki M, Kazuko, Rosalba Encarnación-Dimayuga, y Alma Rosa Cortés A. "Evaluación toxicológica de productos naturales usando microtécnicas." *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas* 36.1 (2005): 11–17. Impreso.
- Awodele, Olufunsho et al. "Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of Moringa oleifera Lam. (Moringaceae)." *Journal of Ethnopharmacology* 139.2 (2012): 330–336. Internet.
- Bakre, Adewale G, Adegbuyi O Aderibigbe, y Olusegun G Ademowo. "Studies on Neuropharmacological Profile of Ethanol Extract of Moringa Oleifera Leaves in Mice." *Journal of Ethnopharmacology* (2013): 1–7. Internet.
- Cantú, Ania Mendoza et al. "Intercalibración de las Pruebas con Daphnia Magna y Pseudokirchneriella Subcapitata en México: Herramientas Potenciales para el Monitoreo Ambiental." 23.1 (2013): 97–110. Impreso.
- Castillo García E, Martínez Solís I. *Manual de Fitoterapia*. Barcelona: N.p., 2007. Impreso.
- Científico, Artigo, y Campina Grande. "Efeito Tóxico do Extrato de Flores De Moringa Oleifera L . para Abelhas Apis mellifera Africanizadas." (2010): 33–37. Impreso.
- Econom, DE. "Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010 Análisis de Agua - Evaluación de Toxicidad Aguda con Daphnia Magna, Straus (Crustacea - Cladocera) - Método de Prueba (cancela a la NMX-AA-087-SCFI -1995)." (2010). Internet.
- Federation, Water Environment. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater." (1999). Internet.
- Ferreira, Paulo M P et al. "Larvicidal Activity of the Water Extract of Moringa Oleifera Seeds Against Aedes Aegypti and Its Toxicity Upon Laboratory Animals." *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 81.2 (2009): 207–16. Impreso.
- Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant*. Internet.
- Guzmán-Maldonado, Salvador Horacio, Alfredo Zamarripa-colmenares, y Lesly Guadalupe. "Calidad Nutricional y Nutraceutica de Hoja de Moringa Proveniente de Árboles de Diferente Altura." 6 (2015): 317–330. Impreso.
- Hm, Osman et al. "Assessment of Acute Toxicity and Ld50 of Moringa Oleifera Ethanol Extract in Albino Rats and Rabbits." 1.4 (2015): 38–43. Impreso.
- Kessler E, Huss VA. "Comparative Physiology and Biochemistry and Taxonomic Assignment of the Chlorella (chlorophyceae) Strains of the Culture Collection of the University of Texas at Austin." Internet.
- Leone, Alessandro et al. "Cultivation , Genetic , Ethnopharmacology , Phytochemistry and Pharmacology of Moringa oleifera Leaves : An Overview." (2015): 12791–12835. Internet.
- Martín, C et al. "Potential Applications of Moringa oleifera: A Critical Review." 36.2 (2013): 137–149. Impreso.
- Medeiros, Louise S et al. "Acute Toxicity and Environmental Risk of Teflubenzuron to Daphnia Magna, Poecilia Reticulata and Lemna Minor in the Absence and Presence of Sediment." *Journal of Environmental Science and Health* 48.7 (2013): 600–6. Internet.
- Michel, Paulo et al. "Safety and Efficacy of Moringa oleifera - Therapeutic and Toxicological Properties." (1785). Internet.
- Núñez, M, y J Hurtado. "Bioensayos de Toxicidad Aguda Utilizando Daphnia Magna Straus (cladocera, Daphniidae) Desarrollada en Medio de Cultivo Modificado." *Rev Peru Biol* 12.1 (2005): 165–170. Impreso.
- Salgar, Somnath T. "Stress in First Year Medical Students." *International Journal of Biomedical and Advance Research* 05.01 (2014): 79–80. Internet.
- Teodorovic, Ivana et al. "Sensitivity of Bacterial Vs . Acute Daphnia Magna Toxicity Tests to Metals." 4.4 (2009): 482–492. Internet.