

Evaluación de la toxicidad sobre *Artemia salina* y tamizaje fitoquímico preliminar de especies de Agaváceas.

Toxic activity evaluation against *Artemia salina* and preliminary phytochemical screening of Agavaceae species.

Autores: Lic. Georgina Berroa-Navarro, Lic. Lázaro Cotilla-Pelier, DrC Oriela Pino-Pérez.

Organismo: Centro de Desarrollo de la Montaña, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), MES.

E-mail: gina@cdm.gtmo.inf.

Resumen.

El trabajo se desarrolló con el objetivo de determinar la composición fitoquímica cualitativa así como la toxicidad sobre *Artemia salina* de varias especies de *Agavaceae* en el Macizo Nipe-Sagua-Baracoa. Para ello fue recolectado el material vegetal en diferentes zonas del Macizo, el cual se clasificó, se lavó y se secó en estufa a 40°C; se obtuvieron los extractos hidroalcohólicos de todas las especies, se evaluó su toxicidad sobre *Artemia salina* según la técnica tradicional y se realizó el pesquizaje fitoquímico semicuantitativo a las especies promisorias. Los resultados mostraron que los extractos hidroalcohólicos provenientes de las especies *A. lechuguilla*, *A. americana* y *A. angustifolia* mantienen actividad relevante sobre el organismo diana a las 24 horas, lo que indica las potencialidades de estas plantas como fuente de compuestos con actividad plaguicida y antitumoral. El pesquizaje fitoquímico detectó la presencia de saponinas, triterpenos y esteroides, taninos, fenoles y flavonoides.

Palabras clave: *Artemia salina*, Agavaceae, Tamizaje fitoquímico, toxicidad.

Abstract.

The work was developed in order to determine the qualitative phytochemical composition as well as the toxicity on *Artemia salina* of several *Agavaceae* species in Nipe Sagua Baracoa group. To achieve this, the vegetal material was collected in different areas of the group; it was classified, washed and dried in an oven at 40°C; there were obtained the hydroalcoholic extracts of all species, their toxicity on *Artemia salina* was evaluated according to the traditional technique and the semiquantitative phytochemical screening of the promising species was carried out. The results showed that the hydroalcoholic extracts from the species *A. lechuguilla*, *A. americana* and *A. angustifolia* keep a relevant activity on the target organism at 24 hours, indicating the potentials of these plants as a source of compounds with pesticidal and antitumoral activity. The phytochemical screening detected the presence of saponins, triterpenes and steroids, tannins, phenols and flavonoids.

Key words: *Artemia salina*, Agavaceae, phytochemical screening, toxicity.

Introducción.

Las Agaváceas son plantas perennes, desde herbáceas a árboles. Hojas fibrosas, sentadas basales o situadas en el extremo de las ramas, en ocasiones con el margen espinoso y succulento. Inflorescencia generalmente en un largo pedúnculo erecto. Flores con 6 pétalos vistosos dispuestos en dos verticilos. Androceo con 6 estambres. Gineceo con generalmente trilocular y fruto en cápsula. Los géneros principales son *Agave* y *Yucca*, aunque existen 18 géneros y 550 especies. Tienen distribución cosmopolita, aunque centrada sobre todo en regiones tropicales o subtropicales de América, desde el Sur de Estados Unidos a los Andes.

Se utilizan en jardinería (*Agave*, *Dracaena*, *Yucca*) y para la obtención de fibras textiles, como el sisal (*Agave sisalana*) (Aedo *et al.*, 2013). El extracto de la planta de Cabuya (*Agave americana*) obtenido como un sub-producto de la agroindustria de la fibra natural, fue evaluado en la búsqueda de un uso potencial, debido a que el residuo líquido al carecer de un manejo adecuado genera graves problemas de contaminación en las fuentes hídricas. Diferentes investigaciones tienden a evaluar el potencial fungicida de éste extracto vegetal y han reportado buenos resultados a nivel de laboratorio sobre los fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporoides*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium spp.* y *Phytophthora infestans* (Álvarez *et al.*, 2013).

Estudios previos reportan que las Agaváceas se caracterizan por presentar en su composición un alto contenido de fibra constituida por ceras, polialcoholes, poliazúcares (González, 2004). También se han detectado la presencia de aminas y/o aminoácidos, grasas, aceites esenciales y esteroides (Agrawal *et al.*, 1985). Numerosas especies de agave, entre las que se encuentra el *Agave brittoniana* T, contienen dentro de sus metabolitos secundarios saponinas esteroidales, las que en dependencia de su estructura pueden presentar múltiples acciones farmacológicas y agrobiológicas (Fernández, 2014).

En tal sentido el presente trabajo se realizó con la finalidad de determinar la composición fitoquímica cualitativa así como la toxicidad sobre *Artemia salina* de varias especies de agaváceas presentes en el Macizo Nipe Sagua Baracoa.

Materiales y métodos.

Recolección y procesamiento del material vegetal.

El material vegetal (hojas) se recolectó en horario de la mañana en las diferentes zonas del Macizo. Todas las especies vegetales se identificaron debidamente y se prepararon muestras para su depósito en el herbario del Centro de Desarrollo de la Montaña (Tabla 1). Las plantas fueron revisadas, separándose las partes en mal estado, se lavaron y se secaron en estufa a 40 °C. Posteriormente se molinaron en un molino de cuchilla (diámetro de partícula) y se conservaron en nylon de polietileno a una temperatura de 20 °C.

Nombre Científico	Nombre común	No. Depósito
<i>Agave lechuguilla</i> L.	Maguey de jardín	CDM - 475
<i>Agave americana</i> L. var. <i>marginata</i>	Agave listado	CDM - 443
<i>Agave atrovirens</i> L.	Maguey	CDM - 473
<i>Agave angustifolia</i> Haw	Agave espadín	CDM - 444
<i>Sansevieria metallica</i> Gerone and Labory	Lengua de vaca	CDM - 416
<i>Yucca elephantipes</i> Baker in Regel	Agave pinito	CDM - 472

<i>Hosta fortunei</i> L.	Malanguita de jardín	CDM - 372
--------------------------	----------------------	-----------

Tabla 1. Datos de las especies vegetales.

Obtención de los extractos hidroalcohólicos.

Para la elaboración de los extractos se tomaron 40 g de cada muestra y se pusieron a macerar en 150 mL de etanol: agua (95:5) a 30°C durante 48 horas, posteriormente se filtraron y se concentraron a vacío. Los extractos se colocaron en frascos ámbar y se guardaron en frío hasta su evaluación biológica.

Ensayo de evaluación de la actividad sobre *A. salina*

El ensayo sobre *A. salina*, indicador de actividad plaguicida y antitumoral se realizó según lo descrito por Meyer (1982). Se utilizaron placas plásticas de 96 pocillos; a cada uno de ellos se le adicionó sucesivamente 200µL de agua de mar (con 5-10 larvas de *A. salina*) y una solución (50µL) de la muestra disuelta en una mezcla de acetona: Tween 20: solución de sal de mar. Los extractos se evaluaron a la concentración final de 1000µg/mL y aquellos con porcentajes de muerte mayores de 50% se consideraron activos (Meyer, 1982). Un total de 8 pozos (réplicas) se utilizaron para cada concentración.

La mortalidad de las larvas se evaluó a las 6 y 24 horas. La muerte se estableció por la falta total de movimientos durante 10 segundos de observación bajo el esteriomicroscopio. Se utilizaron dos controles negativos: uno con el agua de mar y otro con la mezcla acetona-Tween 20-agua utilizada para evaluar las muestras. La prueba se consideró válida si el porcentaje de mortalidad en el control no excedió el 10%. Como plaguicida de referencia se utilizó la rotenona (control positivo) a una concentración de 0.032µL.

Se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo sobre *Artemia*, fue seleccionada la planta cuyo extracto hidroalcohólico produjo un mayor porcentaje de mortalidad y se realizó la extracción del material vegetal correspondiente con tres disolventes de diferente polaridad (n- hexano, cloroformo: acetato de etilo (1:1) y metanol: agua (9:1)). Se obtuvieron los extractos secos y se evaluaron frente a *Artemia* a las concentraciones finales de 1000, 100 y 10µg/mL; se consideraron activos aquellos con valores de LC₅₀ <1000 µg/mL. Los valores de LC₅₀ se calcularon con el empleo del método de análisis estadístico Probit descrito por Finney (1985).

Pesquijaje fitoquímico: Se realizó el pesquisaje fitoquímico semicuantitativo a las especies promisorias según la metodología descrita por López y Ortiz (2003), determinándose la presencia o no de los principales grupos de compuestos (alcaloides, triterpenos y esteroides, saponinas, fenoles y taninos, quinonas, flavonoides y cumarinas, aceites esenciales, resinas, antocianidinas, aminoácidos libres y aminos, azúcares reductores, carbohidratos y/o glicósidos y mucilagos) a través de la realización de ensayos colorimétricos.

Resultados y discusión.

Los extractos hidroalcohólicos provenientes de las especies *A. lechuguilla*, *A. americana* y *A. angustifolia* mostraron actividad relevante sobre el organismo diana a las 24 h, en los dos primeros casos con un 100% de muerte, valor igual al de la rotenona, control positivo utilizado; esto demuestra las potencialidades de estas plantas como fuente de compuestos con actividad plaguicida y antitumoral (Tabla 2); estos resultados están en correspondencia con los obtenidos por otros autores (Brugés y Reguero, 2008; Castillo *et al.*, 2010; Plazas,

2015; Mancebo *et al.*, 2016) quienes utilizaron la *A. salina* para determinar la actividad citotóxica de diferentes extractos vegetales.

Especie	% Muertes (6h)	% Muertes (24h)
<i>A. lechuguilla</i>	100	100
<i>A. americana</i>	91.67	100
<i>A. atrovirens</i>	2.33	18.6
<i>A. angustifolia</i>	17.14	82.86
<i>S. metallica</i>	0	11.11
<i>Y. elephantipes</i>	1.92	3.85
<i>H. fortunei</i>	5.88	7.84
Rotenona	93.5	100

Tabla 2. Actividad biológica frente a *A. salina* de los extractos etanólicos a 1000µg/ml.

Según se muestra en la tabla 3, el *A. lechuguilla* presentó toxicidad media con una LC₅₀ de 66.93 µg/ml y el *A. americana* una toxicidad alta de 3.24 µg/ml, lo que corrobora que ambas son fuentes promisorias de compuestos bioactivos novedosos para el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes plaguicidas. Similares resultados obtuvieron otros autores al emplear esta técnica para la evaluación de la citotoxicidad de extractos vegetales, tal es el caso de Brugés y Reguero (2008) quienes determinaron la concentración efectiva media de extractos etanólicos y acuosos de hojas, tallos y raíces de *Sida rhombifolia* L., la cual se encontró para todos los casos dentro del promedio reportado en la literatura. Castillo *et al.* (2010) encontraron un marcado efecto citotóxico frente al crustáceo *Artemia salina* del extracto metanólico del tallo de *Paullinia fuscescens*. Plazas (2015) encontró toxicidades medias con CL50de 229, 173 y 196 µg/ml de los extractos de hojas de *G. erecta*, *D. alaternoides* y flores de *T. floribunda* presentaron frente a este organismo diana. Así mismo, Mancebo *et al.* (2016) evaluaron la citotoxicidad de extractos del follaje del *P. caribaea* encontrándose valores de LC₅₀ menores de 50 µg/mL. Para todos estos autores estos ensayos fueron de alta importancia en la determinación de las potencialidades bioactivas de las diferentes especies estudiadas.

Especie	% de Muertos			LC ₅₀ (µg/ml)
	10 µg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml	
<i>A. lechuguilla</i>	5.23	60.0	100	66.93
<i>A. americana</i>	16.36	97	98	3.24

Tabla 3. Actividad biológica de extractos hidroalcohólicos de *A. filifera* y *A. americana*.

Como resultado del pesquizaje fitoquímico se detectó la presencia de saponinas, triterpenos y esteroides, taninos, fenoles y flavonoides, compuestos que pudieran estar asociados al efecto biológico observado (tabla 4).

Especies	Metabolitos ensayados													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>A. lechuguilla</i>		++			+++	+	++			+++		+++	+++	
<i>A. americana</i>		++			+++	++	++				++	+	+	

Tabla 4. Resultados del pesquizaje fitoquímico.

Leyenda: 1-alcaloides, 2-triterpenos y esteroides, 3-quinonas, 4-aceites esenciales, 5-saponinas, 6-fenoles y taninos, 7-flavonoides, 8- cumarinas, 9-resinas, 10-antocianidinas, 11-aminoácidos libres y aminas, 12-azúcares reductores, 13-carbohidratos y/o glicósidos y 14-mucilagos.

Estos resultados son de gran importancia pues teniendo un conocimiento total de la composición fitoquímica de las especies es posible hacer una valoración de la actividad que puede tener una determinada especie, ya que por ejemplo la sola presencia de taninos (compuestos oligoméricos [polímero de grupos fenólicos] con un peso molecular > 500 que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal) aporta propiedades insecticidas y antibacterianas, ya que la característica funcional que define a los taninos es su capacidad de unirse a las proteínas. Esta interacción tanino - proteína parece ser la base físico – química de su actividad biológica, tal como su influencia en la fisiología y selección del alimento por los herbívoros (insectos) (Mareggiani, Graciela y Bilotti, G., 1996).

Los terpenos son igualmente metabolitos que poseen actividad fungicida, acaricida, insecticida y fagorrepelente (Al Salch, 1997; Ginorio y col., 1997 y Santana y col., 2004). En particular los triterpenos son sustancias activas que poseen propiedades insecticidas por sus efectos y mecanismos de acción, pues se comportan como antiapetitivos, repelentes, reguladores del crecimiento y tóxicas, causando la muerte por ingestión (Arolas y col., 1997).

Conclusiones.

Los resultados obtenidos demuestran el gran potencial de la familia Agavaceae como una fuente promisoría de compuestos bioactivos novedosos para el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes antitumorales y plaguicidas.

Las especies *A. filifera* y *A. americana* pueden constituir un punto de partida para la elaboración de nuevos y competitivos bioplaguicidas, lo que pudiera estar asociado a la presencia en las mismas de metabolitos secundarios como las saponinas, triterpenos y esteroides, taninos, fenoles y flavonoides.

Recomendaciones.

Continuar los estudios con estas especies frente a organismos diana específicos.

Referencias Bibliográficas.

- Aedo, C., Herrero, A., Quintanar, A. (2013). *Agave* in Castroviejo, S. (coor.), Flora Ibérica Vol. XX: 492-493. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid.
- Agrawal, P. K.; Jain, D. C.; Gupta, R. K., Thakur, R. S. (1985). Carbon -13 spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins. *Phytochem.*; 2424:2479-96.
- Al Salch, F. S. (1997). Flavonoids, saponins, terpenes, tannis have antimicrobial activity. *Pharmacogn International Journal of Pharmacognosy*, 35(1): 38-42.

- Álvarez, D.; Hurtado, M.; Salazar, E. y Arango O. (2013). Evaluación del bioinsumo de fique (*Furcraea gigantea*) en el control del tizón tardío de la papa. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2): 29–36.
- Arolas, B. y col. (1997). Productos naturales en el Manejo integrado de Plagas. En: Tercer Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal. Resúmenes. 23-27 de junio. Palacio de las Convenciones. Ciudad de La Habana, p.180.
- Brugés, K.; Reguero, M. T. (2008). Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. *Revista Colombiana de Biotecnología* 9(001): 5-13.
- Castillo, D.; Lanza, J. G., Crescente, O. (2010). Identificación preliminar de algunos constituyentes del tallo de *Paullinia fuscescens* (Sapindaceae) y actividad biológica. *Avances en Química* 5(1): 57-61.
- Fernández, E. (2014). Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de *Agave brittoniana* T. en un modelo de colitis ulcerativa. [Tesis para optar al título de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas]. Universidad Central de Las Villas Marta Abreu.
- Finney, D. J. (1985). The Median Lethal Dose and Its Estimation. *Archives of Toxicology* 56: 215-218.
- Ginorio, C., Pino, O., Muñiz, Y. (1997). Estudios fitoquímico y biológicos preliminares de especies de las piperáceas con propiedades plaguicidas. En: Tercer Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal. Resúmenes. 23-27 de junio. Palacio de las Convenciones. Ciudad de La Habana. p.161.
- González, M., López, L., González, S., Tenla, J. (2004). Plantas Medicinales del Estado de Durango y zonas aledañas. México D. F: Instituto Politécnico Nacional-PROSIMA.
- López, T., Ortiz, Y. (2003). Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Química de los Productos Naturales. Universidad de Oriente. Facultad de Ciencias Naturales. Dpto. de Farmacia. Santiago de Cuba. p.55.
- Mancebo, B., Regalado, A. I., Lorenzo, E., Díaz, S., Cordero, E., Sánchez, L. M. (2016). Actividad citostática, citotóxica, antibacteriana y cicatrizante de extractos de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (pino macho). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 21(1):96-107.
- Mareggiani, G., Bilotti, G. (1996). Fenoles. En: Plantas insecticidas. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Editado por la Secretaría de Publicaciones. Centro de Estudiantes de Agronomía de Buenos Aires, p. 20 - 31.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobse, L. B., Nichols, D. E., McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta médica* 45:31-34.

Plazas, E. A. (2015). Tamizaje fitoquímico preliminar, evaluación de la actividad antioxidante in vitro y toxicidad de seis especies de Ericaceas colombianas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 19(2):182-199.

Santana, O. y col (2004). Productos naturales bioactivos de interés agrícola. Relación estructura – actividad. En: XIV Congreso Científico del INCA. 9-12 de noviembre. La Habana. Memorias CR-Rom. ISBN 959-7023-27-X. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.