

Artículo reseña

## ENSAYO DE *Artemia*: ÚTIL HERRAMIENTA DE TRABAJO PARA ECOTOXICÓLOGOS Y QUÍMICOS DE PRODUCTOS NATURALES

Oriela Pino Pérez, Fanny Jorge Lazo

Grupo de Plagas Agrícolas, Dirección de Protección de Plantas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Carretera Jamaica y Autopista Nacional, Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: [oriela@censa.edu.cu](mailto:oriela@censa.edu.cu)

**RESUMEN:** Este artículo pretende divulgar entre los investigadores de nuestro país las nociones fundamentales relacionadas con el bioensayo de artemia (*Artemia* spp.). Se recogen los aspectos biológicos generales de este organismo, las distintas variantes experimentales del ensayo y sus posibles aplicaciones, así como las ventajas y desventajas de esta prueba. Se exponen ejemplos de los avances logrados con su utilización, promoviendo su uso entre ecotoxicólogos y químicos de productos naturales, fundamentalmente en el campo del descubrimiento y desarrollo de nuevos plaguicidas de origen natural.

(Palabras clave: *Artemia*; bioensayo; productos naturales)

---

### *Artemia* BIOASSAY: USEFUL WORKING TOOL FOR ECOTOXICOLOGISTS AND CHEMISTS OF NATURAL PRODUCTS

**ABSTRACT:** This paper is aimed at divulging the fundamental notions related to the brine shrimp (*Artemia* spp.) bioassay among the researchers of our country. General biological characteristics of this organism, different experimental variants of the bioassay and their applications, as well as their advantages and disadvantages are summarized. Several examples about the advances achieved with the application of this bioassay are included promoting its use by ecotoxicologists and specialists of natural products, mainly those concerned with the discovery and development of new natural pesticides.

(Key words: *Artemia*; brine shrimp; bioassay; natural products)

---

### INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la agricultura moderna se debe en gran parte, a la aparición y uso de plaguicidas sintéticos para reducir las pérdidas que las plagas causan a los cultivos. Desde los años 50 a los 90, se produjo la expansión de los productos fitosanitarios de síntesis (clorados, carbamatos, fosforados y otros) con acción sobre las principales entidades que resultaban perjudiciales al agricultor: insecticidas, acaricidas, fungicidas, bactericidas, herbicidas, entre otros. Sin embargo, a largo plazo, su uso ininterrumpido y masivo ha producido graves problemas: aparición de resistencia, presencia de residuos en las cosechas,

contaminación del medio ambiente y ruptura de equilibrios naturales. Las plagas continúan evolucionando, convirtiéndose en resistentes a los plaguicidas disponibles, por lo que existe una necesidad constante de desarrollo de nuevos productos para la protección de plantas (1).

En la búsqueda de soluciones alternativas a estos problemas en los últimos años ha resurgido el interés en las plantas y su quimio-biodiversidad como rica fuente de productos bioactivos para el desarrollo de nuevos productos fitosanitarios. Las moléculas deben conjugar una mayor selectividad hacia las plagas, actividad contra las que han desarrollado resistencia

(nuevos modos de acción) y menor impacto sobre los ecosistemas. Universidades, institutos de investigación y compañías de agroquímicos están prestando especial importancia al estudio de productos naturales, en respuesta al creciente interés en el descubrimiento de nuevos productos para el desarrollo de una agricultura sostenible y amigable con el medio ambiente (2).

La necesidad de sustituir los métodos de lucha contra plagas basados en los plaguicidas convencionales, parece evidente por motivos medioambientales y esta necesidad de cambio está determinando la investigación actual en el campo agroquímico. Además de los aspectos medioambientales, otros factores favorecen el retorno al estudio de fuentes naturales como origen de nuevos plaguicidas. Entre ellos figura el gran desarrollo actual de las técnicas de aislamiento y determinación de estructuras químicas, pues trabajos que hace años hubieran requerido mucho tiempo, hoy en día se puedan realizar con rapidez.

La otra tecnología de vital importancia para el descubrimiento y desarrollo de nuevos productos de origen natural son los ensayos biológicos (3). En la última década, se han incorporado algunos ensayos de gran utilidad y eficacia que requieren pequeñas cantidades de muestras y permiten la evaluación rápida de extractos crudos y fracciones, conduciendo con seguridad a los principios activos y descartando todo lo que no sea de interés. Hay que indicar claramente la diferencia entre un estudio de productos naturales convencional, cuyo objetivo es el conocimiento de los componentes químicos de una planta, y la búsqueda de nuevos productos bioactivos que depende siempre de los ensayos biológicos que guían el fraccionamiento y el aislamiento final (3, 4, 5). En muchas ocasiones, el factor clave que ha impedido el descubrimiento rápido de nuevos constituyentes bioactivos ha sido el uso insuficiente e inadecuado de la tecnología del bioensayo (3, 4).

En los últimos años, el objetivo de muchos laboratorios relacionados con el estudio de productos naturales ha sido desarrollar y utilizar nuevos procedimientos de bioensayos; tratando de fomentar métodos baratos y fáciles de utilizar, sin la necesidad de cooperación de otros grupos de investigación (3, 4, 6, 7). Cada investigador realiza sus propios bioensayos de manera rápida, reproducible y obtiene resultados confiables estadísticamente. De esta manera, son detectados y aislados con rapidez compuestos bioactivos novedosos a través del cribado y fraccionamiento biodirigido de los extractos vegetales. El objetivo principal de la investigación no es solamente

aislar moléculas con estructuras novedosas, sino aislar nuevos compuestos bioactivos que tengan aplicaciones potenciales o puedan servir como compuestos guías para las modificaciones sintéticas (3, 8).

Un lugar sobresaliente dentro del grupo de bioensayos más utilizados lo ocupa el ensayo de *Artemia* spp. Este es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los materiales en larvas de *Artemia* spp., y de esta manera se predice su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos y/o ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos (3, 4, 5). Este artículo reseña pretende divulgar entre los investigadores de nuestro país, los aspectos fundamentales relacionados con el desarrollo histórico de este ensayo, sus distintas variantes experimentales y posibles aplicaciones, promoviendo su uso entre ecotoxicólogos y químicos de productos naturales.

## PARTE ESPECIAL

### Aspectos biológicos generales y significado práctico

*Artemia* spp. son camarones minúsculos de cuerpo blando, de color carmelita y transparentes a la luz; pertenecen al Phylum Arthropoda, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda. Se conocen comúnmente por el nombre de artemia, también llamados "monos de mar" o "brine shrimp" en inglés (9). El género *Artemia* está compuesto por varias especies, de las cuales se han identificado al menos cinco especies bisexuales y varias poblaciones partenogenéticas, entre ellas *Artemia salina* Leach, *Artemia persimilis* Piccinelli y Prosdocimi, *Artemia franciscana* Kellogg (bisexuales) y *Artemia partenogenetica* Bowen y Sterling (10, 11).

Estas especies se encuentran distribuidas en todo el mundo en aguas de elevada salinidad, pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35°C. Se alimentan de algas y bacterias y son fuente de alimento para peces, pájaros y varios invertebrados. Las hembras producen huevos que, en condiciones externas favorables, eclosionan produciendo larvas de un tamaño aproximado de 1 mm. Los huevos también pueden formar quistes y permanecer en esta forma por un año o más. Las artemias se convierten en adultos transcurridas 6 a 8 semanas, alcanzando un tamaño promedio de 7mm.

*Artemia* es hasta la fecha el único género animal en todo el mundo cuyo estado criptobiótico (quistes) está disponible comercialmente de manera continua, como fuente de alimentos para peces y crustáceos en acuicultura. Esto ha constituido un elemento clave

en su utilización en ensayos biológicos (12). Por razones prácticas, las especies con un estado criptobiótico, durante su ciclo de vida son más adecuadas para el desarrollo de un bioensayo estándar. La disponibilidad permanente de huevos (quistes) a partir de los cuales pueden ser obtenidas las larvas ofrece las siguientes ventajas:

- no hay necesidad de mantener una colonia viva permanentemente,
- las pruebas pueden realizarse dónde y cuándo sea necesario,
- se dispone siempre de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica.

### Aplicaciones y comparación con otros ensayos biológicos

Las larvas de *Artemia* spp. se han utilizado por más de 40 años en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos (7, 12) y se ha estudiado su biología y usos potenciales en diversos campos como un método práctico y económico para la determinación de bioactividad de compuestos sintéticos y productos naturales (3, 13, 14, 15, 16, 17).

#### Prueba ecotoxicológica para el ambiente marino

Para la protección del ambiente marino, son necesarios métodos de ensayos ecotoxicológicos simples y confiables para determinar el impacto potencial sobre la biota marina de sustancias xenobióticas (7). Además, la implementación correcta de medidas regulatorias, tanto en el ámbito nacional como internacional, requiere que los métodos toxicológicos usados sean confiables y reproducibles (12, 18).

En 1984, Vanhaecke *et al.* (12) del Centro de Referencia de artemia en Bélgica, después de un estudio extensivo de la literatura científica relacionada con el uso de este organismo en investigaciones sobre la contaminación ambiental, desarrollaron un ensayo estándar de toxicidad aguda (a corto plazo), conocido como ARC-TEST o ensayo del Centro de Referencia de *Artemia*. Este ensayo está basado en la determinación de la  $LC_{50}$  a las 24 horas de las larvas (instares II-III) de una cepa específica de *Artemia* sp. El procedimiento fue sometido a un estudio colaborativo que involucró centros de investigación en Europa y América para determinar el grado de estandarización del protocolo experimental propuesto. Al comparar los resultados de este estudio con los obtenidos utilizando los organismos diana de uso común en pruebas toxicológicas, se determinó que la repetibilidad y reproducibilidad son al menos iguales que las de una prueba a corto plazo usando *Daphnia* spp. y aproxi-

madadas en algunos casos a los valores obtenidos utilizando *Brachydanio* spp. Aunque la prueba de artemia fue nueva para las dos terceras partes de los 70 laboratorios participantes, todos reconocieron que esta requiere poca experiencia y no consume mucho tiempo, aunque la sensibilidad del ensayo fue relativamente baja, resultado que relacionan con la cepa y los compuestos de referencia utilizados en este estudio. Los autores concluyeron que este bioensayo es un valioso instrumento como prueba en una primera evaluación para categorizar la toxicidad de productos químicos y como prueba de referencia para el ambiente marino.

#### Evaluación biológica de productos naturales: extractos crudos, fracciones y compuestos puros

Artemia es también útil para predecir actividades plaguicidas y farmacológicas, responde a un amplio rango de compuestos química y farmacológicamente diversos; es por ello que resulta tan importante su aplicación en programas de descubrimiento y desarrollo de nuevos plaguicidas y medicamentos de origen natural (3, 4, 5, 19, 20). Además, el ensayo permite la evaluación rápida de las relaciones estructura-actividad y son fácilmente observables las interacciones entre compuestos (21).

En 1982, Meyer *et al.* (13), fueron los primeros en introducir el uso de las larvas de *Artemia* spp. en sustitución de animales superiores en la evaluación de extractos vegetales para el descubrimiento de compuestos con actividad antitumoral y citotóxica. Este ensayo se utiliza para la pre-evaluación de extractos vegetales en el descubrimiento de compuestos antitumorales (17). Inicialmente, se determinó que existe una correlación positiva entre la mortalidad de las larvas de artemia y la citotoxicidad frente a las células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y la línea celular 3PS(P388) (leucemia *in vivo*) (3). En general, los valores de  $ED_{50}$  para las citotoxicidades son aproximadamente una décima parte de los valores de  $LC_{50}$  encontrados en los ensayos con *Artemia* spp. En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Pardue Cancer Center se utilizó el ensayo de artemia para la evaluación inicial de seis líneas celulares de tumores humanos. De este modo, es posible detectar y entonces monitorear el fraccionamiento de extractos con actividad citotóxica, utilizando el ensayo de mortalidad de larvas más que otros ensayos antitumorales *in vivo* o *in vitro* que resultan más tediosos y costosos. En este centro se han descubierto hasta el momento más de 300 compuestos antitumorales y plaguicidas utilizando este bioensayo en la pre-evaluación (1).

La actividad detectada a través del ensayo de artemia es un indicador de la toxicidad frente a plagas de insectos. Mawardi *et al.* (19) comprobaron la correspondencia entre el efecto frente a las larvas de artemia del extracto crudo de *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) Correa y un alcaloide activo aislado como resultado de su fraccionamiento biodirigido, y la actividad inhibidora del crecimiento de ambas sustancias frente a la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster* Meigen). Otros investigadores, encontraron correspondencia entre los altos niveles de actividad frente a artemia de coumarinas y cromonas presentes en un extracto de *Flourensia thurifera* (Mol.) D.C. y la actividad antialimentaria del mismo frente a *Spodoptera littoralis* Boisduval (22).

El ensayo de artemia resultó preponderante en el descubrimiento de una nueva clase de compuestos conocidos como acetogeninas, reconocidas por sus efectos biológicos diversos (23). En los años 80, investigaciones detalladas condujeron al aislamiento de un número elevado de estos derivados de ácidos grasos de cadena larga, con actividad insecticida. Estas sustancias son venenos estomacales de acción lenta, particularmente efectivos frente a insectos tales como lepidópteros y *Leptinotarsa decemlineata* Say (23, 24). Leatemia e Isman (25, 26) demostraron recientemente que extractos etanólicos y acuosos de semillas de *Annona squamosa* L. son efectivos frente a *Plutella xylostella* L. Un buen número de estos compuestos, tales como asimacina y annonacina, que demostraron una actividad citotóxica potente en el ensayo de artemia (valores de  $LC_{50}$  entre 0,002 y 33  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) poseen un futuro comercial muy promisorio como plaguicidas. Existen patentes obtenidas por investigadores estadounidenses sobre insecticidas basados en acetogeninas provenientes de *Asimina triloba* Dunal (27) y otra patente similar obtenida por Bayer AG (Alemania) basada también en este tipo de compuestos pero a partir de otras especies vegetales pertenecientes al género *Annona* (28). McLaughlin *et al.* (29) han aislado cientos de acetogeninas a partir de las Anonáceas, y muchas de ellas poseen potencial no solo como plaguicidas sino también como agentes anticancerígenos.

Otra aplicación potencial del ensayo de artemia, se relaciona con las ventajas especiales que ofrecen los bioensayos en la estandarización y control de la calidad de productos botánicos heterogéneos (3). Tales productos pueden ser "heterogéneos" debido a la presencia de mezclas de compuestos bioactivos provenientes de la misma fuente botánica o pueden ser mezclas preparadas a propósito. La respuesta biológica deseada con frecuencia no se debe a un

solo compuesto activo sino a una mezcla de ellos, y las proporciones relativas de los compuestos bioactivos individuales pueden variar de un lote a otro mientras que la actividad biológica permanece dentro de los límites tolerables. Por lo tanto, el análisis físico o químico de un componente individual en tales mezclas no es completamente satisfactorio. Para lograr la estandarización y control de la calidad de las materias primas, procesos y productos deben emplearse de forma armonizada los ensayos biológicos y los métodos físico-analíticos, tales como cromatografía, para lograr la sensibilidad requerida frente a las complejidades químicas encontradas en los productos naturales. La estandarización de los productos, empleando este análisis integral químico y biológico de los componentes bioactivos, contribuirá a una aceptación más generalizada de los productos botánicos heterogéneos y generará beneficios pues resultará en la confianza del consumidor.

#### *Comparación del ensayo de artemia con otros ensayos biológicos utilizados en la investigación y desarrollo de productos naturales bioactivos*

En general, todos los sistemas de ensayos biológicos usados en la investigación de nuevos agroquímicos a partir de productos naturales poseen aspectos positivos y negativos. Cada equipo de investigación debe realizar la selección de cuál o cuáles utilizará en correspondencia con los objetivos propios de cada proyecto de investigación, número de muestras a evaluar y cantidad disponible de cada una de ellas, infraestructura y recursos existentes, preparación técnica del personal requerida, entre otros.

En los últimos años se ha incrementado el uso de bioensayos muy específicos, computarizados, *in vitro* basados en los mecanismos de acción. Estos bioensayos simulan los efectos de algunos compuestos previamente conocidos que poseen un mecanismo de acción específico. Muchas compañías químicas multinacionales utilizan una batería de bioensayos "*in vitro*" o incluso pruebas biológicas sin células, que se centran en la actividad sobre enzimas específicas, receptores o rutas bioquímicas. Mientras que tales pruebas biológicas requieren cantidades bajas de material y se logran altos rendimientos de procesamiento "*throughput*", no existe una correspondencia confiable con la eficacia bajo condiciones reales (en campo). Por otro lado, los investigadores deben ser muy cuidadosos con los ensayos biológicos basados en mecanismo de acción, pues deben asegurar que el alcance de estos sea lo suficientemente amplio para incluir mecanismos desconocidos y diversos, así como nuevas entidades químicas. Además, en estos

bioensayos específicos los extractos deben ser analizados muchas veces antes de detectar actividades. Es más recomendable realizar una preevaluación utilizando ensayos generales, desechar los negativos, y utilizar los ensayos específicos con los activos.

Si se trata de ensayos *in vivo* y el propósito de la investigación es descubrir nuevos plaguicidas, ha habido mucha discusión en cuanto al organismo más apropiado para el bioensayo. Algunos investigadores han utilizado las larvas de mosquito (generalmente *Aedes aegypti* L.) como organismo de prueba (3). Si el propósito de la investigación es el desarrollo de un producto contra el mosquito, el mérito de esta prueba biológica es obvio. Por otra parte, Isman *et al.* (30) plantean que si el propósito del estudio es descubrir un insecticida de amplio espectro, o al menos un producto eficaz contra insectos fitófagos, entonces las larvas de mosquito son probablemente un mal indicador pues los extractos de plantas y los productos naturales que son altamente activos contra las larvas de mosquito a menudo muestran una actividad débil, si la hay, contra los insectos fitófagos.

Isman *et al.* (30) en un programa de investigación, dirigido al descubrimiento y desarrollo de insecticidas botánicos, utilizaron rutinariamente dos especies de orugas noctuidas para el estudio de extractos crudos de plantas, su fraccionamiento biodirigido y el aislamiento de los compuestos activos. Estas son *Spodoptera litura* (Fabricius) y *Peridroma saucia* (Hubner); ambos insectos son altamente polífagos de plantas cultivables. Sin embargo, es muy posible obviar compuestos activos al utilizar solo los noctuidos; por ejemplo, los ginkgolidos, sesquiterpenos del *Ginkgo biloba* L., son insecticidas potentes contra *Nilaparvata lugens* (Stal), aunque son inactivos contra *S. litura* (3).

Desventajas comunes a estos ensayos *in vivo*, independientemente de la diana, son la necesidad de mantener una colonia del organismo, se pueden probar cantidades limitadas de muestras al mismo tiempo, la obtención de los resultados toma varios días, y en ocasiones no es posible discriminar si la inhibición del crecimiento se presenta por alteración del comportamiento (efecto antialimentario) o por efecto fisiológico post-ingestión.

Los sistemas de ensayos biológicos simples, son de gran importancia para identificar los principios activos; la prueba de *Artemia* spp. es una prueba biológica general, particularmente útil con este propósito. Un bioensayo general debe ser sensible a un amplio rango de actividades más que estar dirigido a un sis-

tema particular de compuestos o de reacciones (20, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38). La respuesta biológica debe ser lo suficientemente amplia como para incluir diferentes y nuevos mecanismos de acción y estructuras químicas novedosas. La utilidad del ensayo de artemia como un bioensayo general, indicador de varios tipos de actividades, se ha validado por el descubrimiento de centenares de compuestos activos (35, 39, 40).

La eficiencia del método para predecir actividades plaguicidas y farmacológicas es reconocida, no obstante se debe prestar especial atención a dos aspectos al estandarizar este bioensayo: sensibilidad de la especie utilizada y correspondencia entre la actividad frente a artemia y la actividad biológica de interés. Varó *et al.* (11) plantearon que la existencia de diferencias en la biología y fisiología entre especies y cepas del género *Artemia* puede provocar variaciones en las sensibilidades de las distintas formas a los mismos compuestos. Estas observaciones alertan sobre el uso indiscriminado de cualquier fuente de *Artemia* spp., e indican la importancia de reoptimizar el bioensayo general para cada nueva especie y/o cepa usando compuestos de referencia para establecer el grado de sensibilidad de la cepa empleada. También, debe corroborarse en cada caso la correspondencia entre la actividad frente a este organismo y la actividad plaguicida de interés, pues existen autores que sugieren que la ausencia en *A. salina* de estructuras desarrolladas como receptores puede generar la posibilidad de obtener falsos resultados negativos (10).

El ensayo de *Artemia* spp. tiene las ventajas de ser más rápido (24 horas), barato y sencillo (no se requieren técnicas asépticas). Se pueden utilizar fácilmente un gran número de organismos para la validación estadística, no necesita equipamiento especial y se emplean pequeñas cantidades de muestras (2-20mg o menos). Además, no se requiere suero animal que si es necesario para las citotoxicidades. Este sistema de bioensayo puede ser utilizado fácilmente por farmacólogos y químicos de productos naturales; cada técnico de laboratorio conduce sus propias pruebas biológicas, y obtiene de una manera rápida y reproducible los resultados estadísticos confiables del bioensayo. De esta manera, los compuestos bioactivos novedosos se pueden detectar y aislar rápidamente mediante un fraccionamiento biodirigido de los extractos de las plantas. Por último, los defensores de los derechos de los animales no han objetado el uso de estos invertebrados para el trabajo experimental (3).

## Variantes experimentales del ensayo de *Artemia* spp.

Según Vanhaecke y Persoone (12) los aspectos que deben ser considerados para desarrollar una prueba de *Artemia* spp. estándar son los siguientes:

- utilizar los estadios larvales tempranos para pruebas de toxicidad aguda,
- los huevos tienen que eclosionar bajo condiciones estrictamente controladas de temperatura, salinidad, aireación, luz y pH,
- las larvas tienen que ser exactamente de la misma edad al inicio de cada prueba,
- durante la prueba, la larva no debe transformarse en otro estadio con una sensibilidad diferente,
- las pruebas deben realizarse con quistes del mismo origen geográfico,
- las condiciones experimentales de la prueba tienen que ser definidas con gran exactitud,
- realizar una prueba control en paralelo con un químico de referencia.

Existen diferentes variantes experimentales del procedimiento cuyas principales características se presentan a continuación.

### *Ensayo del Centro de Referencia de Artemia*

#### *Alcance y campo de aplicación*

Este método estándar se desarrolló en el Laboratorio de Maricultura del Centro de Referencia de Artemia, Universidad Estatal de Ghent, Bélgica; con el objetivo de determinar la toxicidad aguda en larvas de *Artemia* spp. de: sustancias químicas y afluentes industriales y domésticos considerados por su vertimiento en el ambiente marino (12).

#### *Principio*

Se basa en la determinación de la concentración que causa la muerte 50% de las larvas de artemia en 24 horas bajo las condiciones descritas por este procedimiento. Esta concentración es conocida como  $LC_{50}$ .

#### *Ensayo de toxicidad general*

La prueba se realiza en pequeñas placas Petri de vidrio de 5 cm de diámetro. Se transfieren diez larvas con una pipeta Pasteur a cada placa Petri. El volumen de agua de mar que se toma con las larvas no debe exceder 0,05mL. Posteriormente 10 mL de las concentraciones respectivas del compuesto tóxico (ya aclimatado a 25°C) se añaden a las placas,

que son incubadas en la oscuridad a una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Se desarrolla una prueba preliminar para determinar el rango crítico (una placa Petri por concentración y una como control). Para ello se prepara una serie de diluciones del tóxico con agua de mar artificial. Para sustancias químicas: 10 000; 1 000; 100; 10; 0,1; 0,01 mg.L<sup>-1</sup> y para afluentes: 1 000 000; 100 000; 10 000; 1 000; 10 mg.L<sup>-1</sup>.

Después de 24 horas, se determina el número de larvas muertas en cada placa Petri. La larva es considerada muerta si no se observa movimiento de los apéndices durante 10 segundos. Inmediatamente después del conteo, se mide la concentración de oxígeno en la placa Petri con la menor concentración de compuesto tóxico que induce un 100% de mortalidad.

### *Bioensayo general para productos naturales con actividad biológica*

#### *Alcance y campo de aplicación*

Esta variante la desarrollaron en 1982, Meyer *et al.* (13) y ha sido mejorada desde entonces por diferentes investigadores. Aquí se presenta la versión publicada en 1998 por McLaughlin *et al.* (3). El ensayo permite la evaluación rápida y conveniente de extractos crudos, fracciones y compuestos puros; y además comparar varias partes de la planta y establecer variaciones estacionales en plantas individuales. También puede ser utilizado para establecer la actividad biológica de compuestos sintéticos.

#### *Principio*

Se basa en la determinación de la mortalidad *in vivo* de un organismo zoológico simple, las larvas de *Artemia* spp. en 24 horas a dosis iguales o menores de 1000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (3, 13).

#### *Ensayo de toxicidad general*

Los extractos crudos, fracciones o compuestos puros de origen natural son evaluados a concentraciones iniciales de 10, 100 y 1000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  en viales que contienen 5mL de solución salina y 10 larvas, cada uno es considerado una réplica (tres por concentración). Después de 24 horas, se cuenta el número de larvas muertas. La muerte de las larvas se establece por la falta total de movimientos durante 10 segundos de observación bajo el estereomicroscopio (11, 12). Los valores de  $LC_{50}$  e intervalos de confianza 95%, se calculan usando el método análisis estadístico Probit, programa Polo (LeOra Software, Berkeley, California) (41). La  $LC_{50}$  se define como la concentración de un material tóxico letal al 50% de los organismos de la prueba.

*Ensayo de la movilidad óptica de las larvas de Artemia spp.*

Usualmente, un parámetro conveniente para expresar la toxicidad es la  $LC_{50}$ , pero sus valores no consideran los efectos que son menos severos que aquellos que resultan en la muerte y que sin embargo, constituyen un signo de toxicidad (4). Un nuevo método óptico que mide la movilidad de las larvas de artemia se desarrolló con el objetivo de obtener resultados más exactos y definidos biológicamente. En 1985, Schmidt (9) determinó la inhibición de la motilidad de las larvas en lugar de su letalidad. La actividad de los animales se mide utilizando un contador óptico de motilidad. Esta se calculó considerando el número de interrupciones del haz de luz en 10seg. El procedimiento es más fácil y menos tedioso que contar con un estereomicroscopio. Pueden ser detectados aún pequeños daños en las larvas y esto es una mejora significativa en comparación con otras variantes del método y permite la detección de pequeñas cantidades de toxinas. La desventaja principal relacionada con esta variante experimental, es que exige la disponibilidad de un contador y por esa razón su uso es menos frecuente.

Las dos primeras variantes experimentales descritas se diferencian fundamentalmente en las concentraciones de las muestras que se sugieren para el trabajo, lo que se encuentra condicionado a la interpretación final de los resultados. Como ensayo para establecer las propiedades tóxicas de algunas sustancias es conveniente determinar la cantidad mínima de cada sustancia que representará un peligro para el medio ambiente y el hombre y por tanto, se ajusta el rango de concentraciones en cada caso haciéndose lo más estrecho posible. Para productos naturales, sin embargo, es más eficaz evaluar las muestras en un rango que garantice que los compuestos seleccionados posean el potencial para el desarrollo futuro de un medicamento o un plaguicida y no se inviertan recursos y tiempo en la investigación de compuestos no promisorios.

A partir de estos protocolos de referencia han trabajado numerosos investigadores introduciendo pequeñas variaciones encaminadas fundamentalmente a reducir el volumen de muestra necesario, aspecto este de vital importancia, sobretodo en las últimas etapas de purificación y aislamiento de los compuestos. Por ejemplo, en lugar de viales o placas Petri han sido utilizadas placas de 24 ó 96 pocillos, que requieren menor cantidad de muestra para realizar los estudios biológicos. Estas placas, además, proporcionan la posibilidad de evaluar simultáneamente un mayor

número de muestras y diluciones (8, 10, 21, 42). Otros autores han utilizado discos de papel de filtro sobre el cual se absorbe la muestra y esto contribuye a que la solución de las larvas de artemia se encuentre más limpia de contaminantes y los compuestos a evaluar entren en contacto más eficientemente con los organismos (43).

**Potencialidades de uso del ensayo de artemia en la bioprospección de la flora cubana como fuente de plaguicidas**

Para desarrollar plaguicidas fitoquímicos ambientalmente benignos, se deberá dar un énfasis apropiado a la conservación y estudio de la biodiversidad, aún inexplorada en relación con sus propiedades plaguicidas. Al afrontar estos estudios la química de productos naturales deberá, para lograr aplicación práctica, combinar el uso de técnicas de separación, métodos de elucidación estructural y pruebas biológicas simples, enfoque investigativo que facilita el descubrimiento y desarrollo de nuevos productos bioactivos de origen natural.

Debido a la diversidad de la flora tropical, existe la necesidad de realizar evaluaciones masivas de extractos vegetales para determinar la presencia de compuestos bioactivos pues productos naturales potencialmente activos permanecen sin descubrir, sin investigar, sin desarrollar y/o sin utilizar en este gran depósito de material vegetal. La flora cubana posee enormes potencialidades como fuente de productos activos de origen natural; sin embargo, estas solo han sido explotadas muy someramente. Nuestro país es considerado como uno de los de mayor biodiversidad botánica en el mundo, en lo que se refiere al número total de especies, y tiene la biodiversidad florística más rica de todas las islas en el continente americano y el Caribe insular. Se informan alrededor de 6 700 especies de plantas superiores (agrupadas en 1300 géneros y 101 familias), aproximadamente el 50% de la flora terrestre conocida es endémica y la mayor parte de nuestras especies no han sido investigadas a profundidad (44).

Existe información relacionada con la actividad biológica de muchas de estas plantas y su uso popular como medicamentos y plaguicidas naturales, pero los compuestos activos no se han estudiado en la mayoría de los casos (8). El trabajo realizado en el área del descubrimiento y desarrollo de sustancias con actividad plaguicida es aún más reducido (45). Si bien es cierto, que el campesinado cubano ha hecho uso empírico de las propiedades de las plantas para proteger sus cultivos de las plagas, no existe un estudio científico sistemático y riguroso que sustente o res-

palde este conocimiento tradicional, y mucho menos que abarque un grupo numeroso de especies vegetales que no han sido estudiadas como plaguicidas potenciales. Las investigaciones encaminadas al aislamiento y caracterización de los compuestos responsables de la actividad plaguicida son también muy escasas (21).

Pino *et al.* (8) realizaron la evaluación biológica frente a *A. salina* de 123 extractos obtenidos a partir de plantas de las familias *Anacardiaceae*, *Asteraceae*, *Clusiaceae*, *Myrtaceae* y *Poaceae*. Este trabajo es el primero desarrollado en Cuba en el cual la investigación de nuevas fuentes de plaguicidas potenciales se realiza utilizando el fraccionamiento dirigido por el ensayo de artemia. Los resultados de este estudio químico y biológico de varias especies de la flora cubana, la mitad de ellas endémicas y algunas de ellas investigadas por primera vez, representan un aporte al conocimiento de nuestra biodiversidad botánica valorando sus potencialidades como fuentes de plaguicidas. Desde el punto de vista social y económico la identificación de compuestos activos como candidatos potenciales para el desarrollo de nuevos productos fitosanitarios brinda nuevas alternativas, eficaces y ambientalmente seguras, para nuestra agricultura en el campo de la Protección de Plantas.

La extensión del uso de este ensayo general al estudio de nuestra biodiversidad, como fuente de compuestos activos, simplificaría y aumentaría las posibilidades de evaluación biológica incrementando el conocimiento en general sobre nuestros recursos naturales y consecuentemente su uso sostenible. Las ventajas del uso de un ensayo general como este, podrán ser aprovechadas además para la evaluación biológica de compuestos de origen sintético, lo cual representa un elemento muy importante en el avance no solo de la Química de Productos Naturales sino también de la Síntesis Orgánica y la Bioinformática.

## CONCLUSIONES

El uso combinado de ensayos biológicos como el de *Artemia* con las tecnologías de separación y elucidación estructural actuales guiará a los químicos de productos naturales en el descubrimiento de compuestos altamente promisorios para su desarrollo como plaguicidas de origen natural. Su aplicación en nuestro país, proporcionará un valioso instrumento que contribuirá a la búsqueda de nuevas alternativas para el control de plagas en la agricultura, centrando las investigaciones y los recursos disponibles en los candidatos más prometedores.

## REFERENCIAS

1. Isman MB. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Ann Rev Entomol.* 2006;51:45-66.
2. Copping LG, Duke SO. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Manag Sci.* 2007;63:524-554.
3. McLaughlin JL, Lingling LR, Anderson JE. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information J.* 1998;32:513-524.
4. Fatope M. Phytochemicals: Their bioassay and diversity. *Discov Innov.* 1995;7(3):229-235.
5. Fatope M, Ibrahim H, Takeda Y. Screening of higher plants reputed as pesticides using Brine shrimp Lethality Assay. *Int J Pharmacog.* 1993;4:250-254.
6. Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology.* 2002;2:17.
7. Torokne A, Vasdinnyi R, Asztalos BM. A Rapid Microbiotest for the Detection of Cyanobacterial Toxins. *Environ Toxicol.* 2007;64-68.
8. Pino Pérez O, Jorge Lazo F, Leon Díaz O, Khambay BPS, Branford-White C. Cuban flora as a source of bioactive compounds. *The International Journal of Cuban Studies.* 2008;1(1):1-9.
9. Schmidt, R. Optical motility test for the detection of Trichothecenes using Brine shrimp. *Mycotoxin Res.* 1985;1:25-29.
10. Serrano C, Ortega T, Villar A. Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala. *Artemia salina* Bioassays: A revision. *Phytotherapy Res.* 1996;10:S118-S120.
11. Varó I, Serrano R, Navarro JC, Lopez FJ, Amat F. Acute Lethal Toxicity of the Organophosphorus Pesticide Chlorpyrifos to Different Species and Strains of *Artemia*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1998;61:778-785.
12. Vanhaecke P, Persoone G. The ARC-Test: a standardized short-term routine toxicity test with

- Artemia nauplii*. Methodology and evaluation. Ecotoxicological Testing for the Marine Environ. 1984;143-157.
13. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 1982; 45:31-34.
  14. McLaughlin JL. Bench-top bioassays for the discovery of bioactive compounds in higher plants. *Brenesia.* 1991;34:1-14.
  15. Lhullier C, Horta PA, Falkenberg M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Braz J Pharmacogn.* 2006;16:158-163.
  16. Stefanello MEA, Salvador MJ, Ito IY, Macari PAT. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* spp. *fl occosa*. *Braz J Pharmacogn.* 2006;16:525-530.
  17. Silva TMS, Nascimento RJB, Batista MM, Agra MF, Camara CA. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. *Braz J Pharmacogn.* 2007;17(1):35-38.
  18. Loschau M, Kratke R. Efficacy and toxicity of self-polishing biocide-free antifouling paints. *Environ. Pollution.* 2005;138:260-267.
  19. Mawardi R, Hazar B, Mohd I, Farediah A, Rahman M, Mohd A. Screening of tropical plants for the presence of bioactive compounds. *Pertanika.* 1992;15(2):131-135.
  20. Garrett R, Rodrigo AS, Cruz MS, Guerra MG, Rocha L. Antibacterial activity of essential oil from *Ocotea notata* guided on the Brine shrimp lethality bioassay. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromaticas.* 2007;6(6):344-345.
  21. Pino Pérez O, Jorge Lazo F, Tacoronte Morales JE, Khambay BPS. Aislamiento y caracterización de compuestos activos de *Mammea americana* L. *Revista Cubana de Química.* 2007;19(1):74-77.
  22. Faini F, Labbe C, Salgado I, Coll, J. Chemistry, Toxicity and Antifeedant Activity of the Resins of *Flourensia thurifera*. *Biochemical Systematics and Ecology.* 1997;25(3):189-193.
  23. Álvarez Colom Olga, Barrachina Isabel, Ayala Mingol I, González Mas M Carmen, Moya Sanz Pilar, Neske Adriana, Bardón Alicia. Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. *J Pest Sci.* 2008;81:85-89.
  24. Álvarez Colom Olga, Neske A, Popich S, Bardón A. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: *Annonaceae*) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) *J Pest Sci.* 2007;80:63-67.
  25. Leatemia JA, Isman MB. Efficacy of crude seed extracts of *Annona squamosa* against diamondback moth, *Plutella xylostella* L. in the greenhouse. *Int J Pest Manag.* 2004;50:129-133.
  26. Leatemia JA, Isman MB. Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp., *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against lepidopteran larvae. *Phytoparasitica.* 2004;32:30-37.
  27. Mikolajczak KL, McLaughlin JL, Rupprecht JK. 1988. U.S. Patent No. 4721727.
  28. Moeschler HF, Pfuger W, Wendlich D. 1987. U.S. Patent No. 4689323.
  29. Johnson HA, Oberlies NH, Alali FQ, McLaughlin JE. Thwarting resistance: annonaceous acetogenins as new pesticidal and antitumor agents. In: Cutler SJ, Cutler JG, editors. *Biological Active Natural Products: Pharmaceuticals*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2000.p.173-83.
  30. Isman MB, Matsura H, MacKinnon S, Durst T, Towers G, Arnason J. Phytochemistry of the Meliaceae: So many terpenoids, so few insecticides. *Rec Adv Phytoch.* 1996;30:155-178.
  31. Silva TMS, Silva TGD, Martins RM, Maia GLA, Cabral AGS, Camara CA, et al. Molluscicidal activities of six species of Bignoniaceae from north-eastern Brazil, as measured against *Biomphalaria glabrata* under laboratory conditions. *Ann Trop Med and Parasitol.* 2007;101(4):359-65.
  32. Soberón JR, Sgariglia MA, Sampietro DA, Quiroga EN, Vattuone MA. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. *J Appl Microbiol.* 2007;102(6):1450-1461.

33. Rodríguez-López V, Figueroa-Suárez MZ, Rodríguez T, Aranda E. Insecticidal activity of *Vitex mollis*. *Fitoterapia*. 2007;78(1):37-39.
34. Kirira PG, Rukunga GM, Wanyonyi AW, Muregi FM, Gathirwa JW, Muthaura CN, Omar SA, Tolo F, Mungai GM, Ndiege IO. Anti-plasmodial activity and toxicity of extracts of plants used in traditional malaria therapy in Meru and Kilifi Districts of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;106(3):403-7.
35. Badisa RB, Ayuk-Takem LT, Ikediobi CO, Walker EH. Selective Anticancer Activity of Pure Licamichauxiioic-B Acid in Cultured Cell Lines. *Pharmaceutical Biology*. 2006;44(2):141-5.
36. Niño J, Correa YM, Mosquera OM. Antibacterial, Antifungal, and Cytotoxic Activities of 11 Solanaceae Plants from Colombian Biodiversity. *Pharmaceutical Biology*. 2006;44(1):14-18.
37. Niño J, Narváez DM, Mosquera OM, Correa Yaned M. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from Colombian biodiversity. *Braz J Microbiol*. 2006;37:566-570.
38. de S. Luna J, dos Santos AF, de Lima MRF, de Omena MC, de Mendonça FAC, Bieber LW, et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2005;97(2):199-206.
39. Juma BF, Majinda RRT. Constituents of *Erythrina lysistemon*: their brine shrimp lethality, antimicrobial and radical scavenging activities. *Natural Product Communications*. 2006;1(2):101-107.
40. Javidnia K, Miri R, Rezai H, Jafari A, Azarmehr A, Amirghofran Z. Biological Activity and Aryltetraline Lignans of *Linum persicum*. *Pharmaceutical Biol*. 2005;43(6):547-550.
41. Finney DJ. The Median Lethal Dose and Its Estimation. *Archives of Toxicology*. 1985;56:215-218.
42. Solis P, Wright C, Anderson M, Gupta M, Phillipson D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Med*. 1996;59:250-252.
43. Taha A, Alsayed H. Brine shrimp bioassays of ethanol extracts of *Sesuvium verrucosum*, *Salsola baryosma* and *Zygophyllum quatarense* medicinal plants from Bahrain. *Phytotherapy Res*. 2000;14:48-50.
44. Zambrana T, Fernández MA. Recursos fitogenéticos autóctonos y manejo de la biodiversidad. ACPA, Producción e Industria Animal. 2003;22(2):27-30.
45. Pérez N, Vázquez L. Manejo ecológico de plagas. En: Transformando el campo cubano. Funes F, García L, Bourque M, Pérez Nilda, Rosset P, editores. ACTAF, Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales, La Habana, Cuba. 2001. p. 121-224.

(Recibido 30-9-2008; Aceptado 8-9-2009)