

Evaluación de la Toxicidad Aguda Oral del extracto etanólico de *Tephrosia vogelii* Hook (kalembe)

Oral Acute Toxicity of a *Tephrosia vogelii* Hook (kalembe) ethanolic extract

Armindo Paixao^{1✉}, Betty Mancebo², Ada Ibis Regalado², Daine Chong², Luz María Sánchez²

¹ Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad José Eduardo dos Santos, Huambo, Angola.

² Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Se realizó un estudio experimental con el objetivo de evaluar el posible efecto tóxico de un extracto etanólico de *Tephrosia vogelii* Hook en ratas *Sprague dawley* hembras. Se evaluaron los niveles de dosis de 2000, 1000, 500 y 250 mg/kg. Se determinaron la mortalidad, los signos tóxicos evidentes, el efecto sobre el peso corporal, el peso de los órganos y se realizó el análisis histopatológico de los órganos que presentaron lesiones macroscópicas. Las dosis de 2000, 1000 y 500 mg/kg provocaron la mortalidad en más del 50 % de los animales del estudio, donde las dos primeras produjeron la aparición de signos tóxicos evidentes y lesiones en los órganos. La administración de la dosis de 250 mg/kg no provocó la aparición de efectos tóxicos. Según el ensayo de toxicidad aguda oral por el método de las clases (CTA), este extracto se clasifica como categoría 3 (moderadamente tóxico).

Palabras clave: toxicidad aguda, método de las clases, *Tephrosia vogelii* Hook, extracto etanólico.

ABSTRACT: An experimental study was conducted to assess the potential toxic effect of a *Tephrosia vogelii* Hook ethanolic extract in female *Sprague dawley* rats. Dose levels of 2000, 1000, 500 and 250 mg/kg were evaluated. Different parameters such as mortality, evident toxic signs, effect on body weight, organ weight and histopathological examination showing gross lesions were determined. The doses of 2000, 1000 and 500 mg/kg had induced mortality over 50 % of the animals under study, where the first two produced the onset of apparent toxic signs and lesions in the organs. The administration of doses of 250 mg/kg did not show the occurrence of toxic effects. The extract was classified as Category 3 (moderately toxic extract) according to the oral acute toxicity test by the class method (CTA).

Key words: acute toxicity, class method, *Tephrosia vogelii* Hook, ethanolic extract.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales constituyen una valiosa alternativa terapéutica y su validación científica es una necesidad. La introducción de estas en la práctica clínica debe efectuarse sobre una base científica que valide tanto sus acciones farmacológicas como su toxicidad (1,2). Existe una ruta crítica establecida para la evaluación y el desarrollo de productos farmacéuticos que

está conformada por una serie de fases de cumplimiento obligatorio, que incluyen evaluaciones farmacológicas y toxicológicas experimentales. Para ello, se hace necesario brindar seguridad en los tratamientos, por lo que los estudios toxicológicos son imprescindibles antes de llevar un producto a fase clínica (3).

✉ Autor para correspondencia: Armindo Paixao. E-mail: armindo7000@hotmail.com

Recibido: 24/11/2016

Aceptado: 30/1/2017

Tephrosia vogelii Hook, conocida comúnmente como kalembé, es una planta utilizada en la medicina tradicional en Angola y en otros países de África con muchas finalidades. A esta planta se le atribuyen diversas propiedades terapéuticas como son antihelmíntica, antifúngica, en el tratamiento de la tuberculosis, de la sífilis, como repelente, entre otras (4).

La legislación actual exige que, previamente al registro y comercialización, se evalúe la seguridad de todo tipo de producto, por lo que resulta imprescindible utilizar ensayos de toxicidad predictivos, con el fin de anular o minimizar el uso de compuestos en los que la relación riesgo/beneficio los declare indeseables para la sociedad (5,6).

Con la introducción de los nuevos métodos toxicológicos alternativos, ha surgido una variante para la estimación y evaluación de las características tóxicas de una sustancia por vía oral, que tiene como objetivo la identificación de estas mediante un método alternativo (toxicidad aguda por el método de las clases: CTA) al ensayo clásico. La aplicación de los métodos alternativos en el campo de la toxicología coincide con la oposición social al uso indiscriminado de animales de experimentación, así como la necesidad que tenía esta ciencia de dar un paso de avance en la evaluación del riesgo de toxicidad, que en ocasiones solo queda en la descripción del daño que proporcionan los métodos tradicionales (6,7).

Teniendo en cuenta el uso tradicional de esta planta y el interés farmacológico por desarrollar un fitomedicamento a partir de ella, se hace necesario evaluar su potencial tóxico a través del método de las Clases de Toxicidad (CTA), para determinar los signos derivados de la exposición a dosis única de un extracto etanólico seco procedente de la planta en estudio y evaluar los daños asociados a su administración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las hojas de la planta *Tephrosia vogelii* Hook se recolectaron en Huambo, Angola,

entre los meses de febrero y marzo (periodo lluvioso) de 2013. El material vegetal se secó a la sombra al aire libre por un periodo de 15 a 20 días. Posteriormente, se trituró en un pilón tradicional y se procedió a la reducción del tamaño de partícula con un tamiz. El polvo obtenido se depositó en bolsas plásticas previamente identificadas, protegidas del calor y la humedad para su posterior traslado al laboratorio de Fitoquímica del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Cuba. Se depositó una muestra de la planta en el herbario del Centro Nacional de Botánica de Luanda, con el código Hb74.

Para la preparación del extracto etanólico se tomaron 100 g y se maceraron en 250 ml de etanol por 24 horas. Posteriormente, se colocó en reflujo por ocho horas, se filtró y se llevó a sequedad mediante rotovaporación (Rotovapor-R, BÜCHI) a presión reducida hasta la eliminación total del disolvente orgánico. Para el estudio se emplearon ratas hembras *Sprague dawley* adultas jóvenes con un peso corporal promedio de 210-220 g. Los animales se suministraron por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB); estos estaban clínicamente sanos y las hembras eran nulíparas y no grávidas.

Se controlaron diariamente las condiciones ambientales del local de experimentación, la temperatura, la humedad relativa y la iluminación. Durante el estudio la temperatura del local se mantuvo entre 20-23°C y la humedad relativa entre 60-70 %, con un fotoperiodo de 12x12; el acceso al agua y al alimento (pienso estándar para la especie) fue *ad libitum*. Previo al inicio de cada ensayo, el área se sometió a limpieza mecánica mediante desinfección química con vapores de formol y permanganato de potasio y control microbiológico ambiental. Los animales se mantuvieron en readaptación ambiental durante siete días, periodo en el cual se realizaron observaciones para detectar cualquier manifestación clínica que indicara alguna alteración. En el proceso de aceptación

preexperimental se seleccionó al azar el 10 % de los animales y se realizó el control de salud de los mismos.

Los estudios se realizaron de acuerdo con los Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio establecidos por la OECD y de seguridad sanitaria medioambiental que exige el Centro para el Control Estatal de Medicamentos (CECMED), como autoridad regulatoria nacional y los códigos internacionales para el cuidado y el uso de animales de laboratorio (8,9). Toda la manipulación de los animales se realizó según los principios éticos para el uso de los animales de Laboratorio de la República de Cuba y los procedimientos establecidos en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.

El estudio de toxicidad aguda oral se realizó acorde a lo descrito en la Norma 423 de la OECD, que describe el método de la Clase Tóxica Aguda (10). Los animales se alojaron individualmente en cajas plásticas. El alimento se retiró 18 horas antes de la administración y se suministró pasadas tres horas del tratamiento. Se conformaron dos grupos experimentales (control negativo y tratado) conformados por tres hembras cada uno, distribuidos aleatoriamente. Al grupo control negativo se le administró agua destilada y al grupo tratado extracto etanólico de las hojas de *Tephrosia vogelii* en una dosis de 2000 mg/kg. Se exploraron diariamente los animales por observación clínica, con especial énfasis en ojos, mucosas, piel, sistema respiratorio, patrones de comportamiento, actividad motora, convulsiones, aparición de diarrea, letargo, salivación, sueño y coma. La inspección clínica de los animales se realizó al menos una vez al día, con mayor frecuencia si se observaban alteraciones tóxicas para minimizar la pérdida de animales en el estudio. La duración de cada observación dependió del tiempo que tardaron en aparecer y desaparecer los signos de toxicidad o muerte de los animales.

Los animales se pesaron antes de iniciar el estudio y a los siete y 14 días posteriores. El día 14 los animales se sometieron a eutanasia por dislocación cervical y se procedió a la

evaluación anatomopatológica de los órganos. Se realizó el análisis macroscópico y la histopatología de los órganos, para lo cual las muestras se fijaron e incluyeron en parafina y se cortaron y colorearon con hematoxilina-eosina.

Se repitió el ensayo posteriormente en iguales condiciones con la dosis de 1000 mg/kg y luego se hizo necesario reducir los niveles de dosis a evaluar, para lo cual se realizó un nuevo experimento con tres grupos experimentales, un grupo control y otros dos grupos con el extracto etanólico de *Tephrosia vogelii* en los niveles de dosis de 500 y 250 mg/kg.

Los datos registrados sobre el comportamiento del peso corporal y el peso de los órganos para cada dosis se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Para ello se empleó el paquete estadístico Infostat 2.0 y se empleó como nivel de significación 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de la toxicidad aguda oral del extracto etanólico de las hojas de *Tephrosia vogelii*, en una dosis máxima de 2000 mg/kg, mostró una alta toxicidad del extracto, que se caracterizó por el registro de dos animales muertos pasados 45 minutos de la administración de la sustancia. Adicionalmente, se presentaron diferentes signos de toxicidad aguda en los animales: disnea, jadeo y convulsiones. Los hallazgos macroscópicos durante la necropsia mostraron restos de vómito alrededor de la boca, rigidez muscular, esfínter anal relajado, midriasis bilateral, ligera deshidratación, enfisema subcutáneo y congestión cerebral. Durante el análisis macroscópico, el hígado fue el órgano que presentó mayores lesiones: coloración oscura, hepatomegalia, bordes redondeados y flacidez.

La evaluación con 1000 mg/kg mostró similares resultados a los encontrados con la dosis previamente descrita. También se encontraron algunas alteraciones macroscópicas, como son la rigidez muscular,

la dilatación del ventrículo izquierdo, el bazo ligeramente aumentado de tamaño, los riñones flácidos, así como órganos congestivos. De igual manera, el hígado mostró bordes redondeados, coloración roja oscura y hepatomegalia.

En el caso de los medicamentos antiparasitarios genéricos o alternativos, tanto para uso humano como para animales, existe una alta probabilidad de encontrar respuestas tóxicas asociadas a su estrecho margen de seguridad, por lo que para este tipo de sustancias se hace necesario considerar este aspecto en el desarrollo de un medicamento para la definición de la dosis efectiva de actividad antihelmíntica y no tóxica al hospedero (11).

El extracto etanólico de hojas de *Tephrosia vogelii* evidencia la presencia de una variedad de metabolitos secundarios, como son los taninos, los alcaloides, los triterpenos y los esteroides en concentraciones notables, los cuales se presume que se encuentran asociados a las propiedades medicinales que se les atribuyen tradicionalmente (12). Esta especie ha mostrado una diversidad química de compuestos, entre los que se encuentran los rotenoides y los glicósidos de flavonoides. La presencia de rotenona no es mayoritaria en el extracto pero esta y otros compuestos pueden estar asociados a la manifestación de toxicidad encontrada en los animales en las dosis de 2000 y 1000 mg/kg. La rotenona, sustancia empleada por décadas como insecticida, ha mostrado toxicidad, lo que conllevó a la suspensión en su aplicación. Con relación a la toxicidad de los compuestos aislados de la *Tephrosia vogelii*, la Organización Mundial de Salud (OMS) clasifica a la rotenona como un compuesto moderadamente peligroso Clase II (2001), así como el resto de los rotenoides de estas especies que poseen apreciable toxicidad (13,14).

Los resultados de Githiori *et al.* (15) demuestran que el uso repetido de la planta *Albizia anthelmintica* contra el parásito *H. contortus* en ovinos da lugar a la aparición de

toxicidad y que una dosis de 1000 mg/kg produce la muerte en ratones (15).

Por la toxicidad encontrada en los niveles de dosis de 2000 y 1000 mg/kg se ensayaron las dosis de 500 mg/kg y 250 mg/kg. Durante el estudio de toxicidad aguda oral de la dosis de 250 mg/kg del extracto etanólico de *Tephrosia vogelii* en ratas, no se produjeron muertes en las primeras 24 horas ni en los 14 días de observación posteriores a la administración. De los animales tratados con la dosis de 500 mg/kg, se registró un animal muerto dos horas posteriores al tratamiento.

La administración de la dosis de 250 mg/kg del extracto etanólico de *Tephrosia vogelii* no evidenció la manifestación de signos clínicos. Se registró una conducta normal en los animales, con reflejo postural normal, hábitos de aseo y respuesta habitual a los estímulos nociceptivos, además del consumo de alimentos y agua como corresponde a su especie. No se observó algún signo de toxicidad evidente ni muerte de los animales de experimentación durante todo el periodo de observación.

Al realizar la inspección clínica de los animales tratados con la dosis única de 500 mg/kg de extracto etanólico de *Tephrosia vogelii*, hubo un animal del grupo tratado que manifestó, 15 minutos posteriores al tratamiento, signos tóxicos como disnea, jadeo y náuseas; su muerte se registró dos horas después. El resto de los animales de este grupo no manifestó signos tóxicos luego del tratamiento y durante el resto de los 14 días correspondientes al periodo de observación.

El peso corporal, como indicador de toxicidad, se comportó de forma variable, pues a pesar de haber diferencia significativa entre los pesos iniciales de los grupos tratados y control, el ritmo de crecimiento de los animales del grupo control se vio dentro de los parámetros establecidos para la curva de crecimiento de la especie y de la línea de investigación; ya para el nivel de dosis de 250 mg/kg se observó lentitud en el ritmo en los

primeros siete días y se recupera de 7-14 días, sin diferencia significativa con relación al grupo control. El grupo tratado con niveles de dosis de 500 mg/kg mostró una ligera disminución de este parámetro a los siete días, los cuales se revertieron a los 14 días, donde se evidenció una ganancia de peso normal y, aún así presentó diferencias significativas respecto al grupo control. En la [Figura 1](#) se muestra el comportamiento del peso corporal de los tres grupos durante la investigación.

En el análisis macroscópico de los órganos no se observaron lesiones en los órganos de los animales tratados con la dosis de 250 mg/kg con respecto a los animales del grupo control.

Al analizar el peso de los órganos de los animales en estudio, no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos tratados ([Figura 2](#)).

En el análisis histopatológico de los animales muertos tratados con el extracto etanólico de *Tephrosia vogelii* en dosis de 2000

mg/kg, 1000 mg/kg y 500 mg/kg, se observaron lesiones en órganos como: cerebro, corazón, riñones, hígado, bazo y pulmones. Los órganos más afectados fueron el hígado, los riñones y los pulmones. Las lesiones características encontradas en todos los órganos son de tipo vascular: rotura de vasos y hemorragias, que se acentúan fuertemente en los pulmones; lo anterior pudiera estar relacionado con la muerte por asfisia de los animales ([Figuras 3, 4 y 5](#)).

Otras especies de este género manifiestan efecto nefroprotector en el daño agudo inducido por la gentamicina en riñones de ratas; tales el caso del extracto etanólico de las hojas de *Tephrosia purpurea*, donde se detectó la presencia de carbohidratos, alcaloides, glicósidos, proteínas, compuestos fenólicos, aceites volátiles, aminoácidos, flavonoides y saponinas y, posteriormente, se identificaron los flavonoides rutina y quercetina en la dosis de 200 mg/kg. Sin embargo, el máximo de dosis tolerada de este extracto fue 2000 mg/kg ([16](#)).

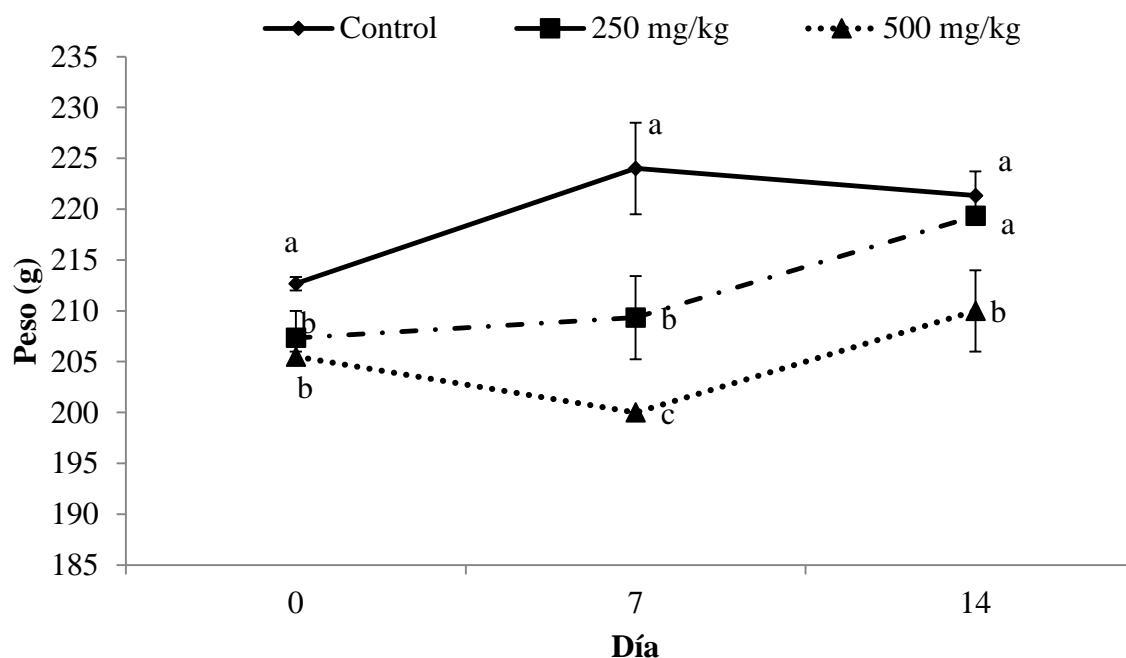


FIGURA 1. Comportamiento del peso corporal de los animales en el estudio de toxicidad aguda oral a dosis de 250 y 500 mg/kg p.c. Todos los valores se presentan como media \pm EE. ($p < 0,05$), (Prueba de Kruskal Wallis)./ *Body weight behavior of animals under the oral acute toxicity study at doses of 250 and 500 mg/kg b.w. All values are presented as mean \pm SE. ($p < 0.05$) (Kruskal Wallis test).*

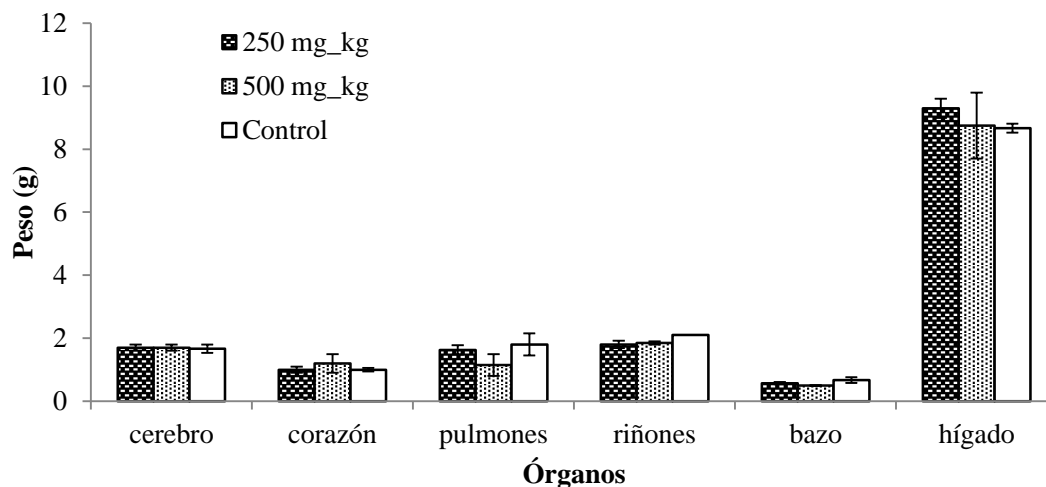


FIGURA 2. Peso de los órganos. Estudio de toxicidad aguda oral a dosis de 250 y 500 mg/kg p.c. Todos los valores se presentan como media \pm EE. ($p < 0,05$), (Prueba de Kruskal Wallis)./
Weight of organs. Oral acute toxicity study at doses of 250 and 500 mg/kg b.w. All values are presented as mean \pm SE. ($p < 0.05$) (Kruskal Wallis test).

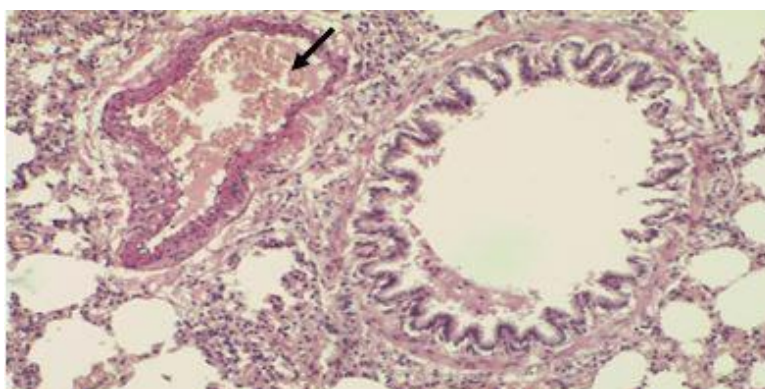


FIGURA 3. Arteritis y presencia de glóbulos rojos en el interior de bronquiolos en pulmón de rata en estudio de toxicidad aguda oral con extracto etanólico de *Tephrosia vogelii* (10 X)./
*Arteritis and presence of red blood cells inside the bronchioles of rat lung under oral acute toxicity study with *Tephrosia vogelii* ethanolic extract (10X).*

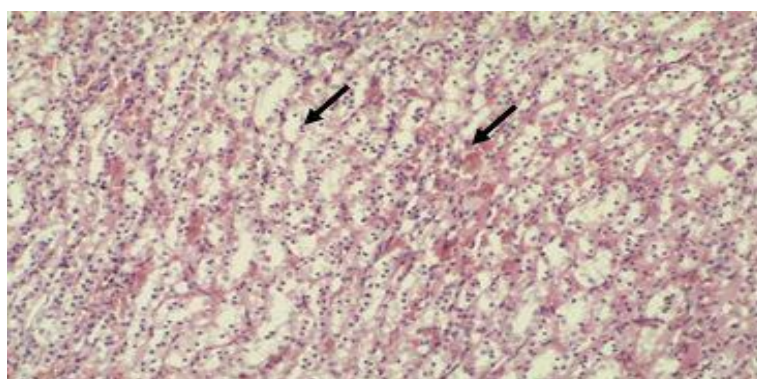


FIGURA 4. Túbulos renales sin núcleos celulares y hemorragias difusas en riñón de rata en estudio de toxicidad aguda oral con extracto etanólico de *Tephrosia vogelii* (20 X)./
*Renal tubules without cell nuclei and diffuse haemorrhages in rat kidney under oral acute toxicity study with *Tephrosia vogelii* ethanolic extract (20 X).*

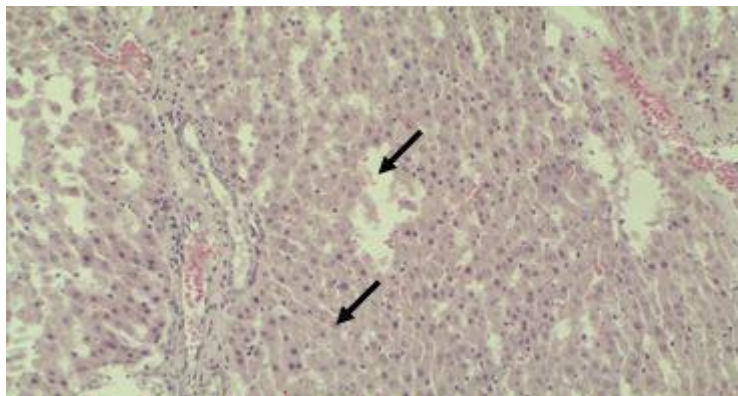


FIGURA 5. Disociación de los sinusoides hepáticos, congestión y hemorragia severa en hígado de rata en estudio de toxicidad aguda oral con extracto etanólico de *Tephrosia vogelii* (20 X)./Dissociation of hepatic sinusoids, congestion and severe haemorrhage in rat liver under oral acute toxicity study with *Tephrosia vogelii* ethanolic extract (20 X).

CONCLUSIONES

La administración oral del extracto etanólico total de *Tephrosia vogelii* Hook (kalembe), en un nivel de dosis de 250 mg/kg no presentó efectos tóxicos en los animales ensayados según las variables estudiadas. Este extracto, según el ensayo de toxicidad aguda oral por el método de las clases (CTA), se enmarca como categoría 3 (moderadamente tóxico), en las condiciones experimentales evaluadas.

REFERENCIAS

1. Morón F. Medicinal plants, medicine and health systems. Rev. Cubana Plant Med. 2012;17(3).
2. Smith C, Larsen HO, Pouliot M. People, plants and health: a conceptual framework for assessing changes in medicinal plant consumption. J Ethnobiol Ethnomed. 2012;8(43):2-11.
3. Berenguer R, Azalea C, Castillo A, Salas H, Puente E, Betancourt J, et al. Acute oral toxicity of *Azadirachta indica* (Neem Tree). Rev Cubana Plant Med. 2013;18(3):502-507.
4. Dzenda T, Ayo JA, Adelaiye AB, Auda AO. Ethno-medical and veterinary uses of *Tephrosia vogelii* Hook: a review. Niger Vet J. 2007;28(3):24-39.
5. Durmic Z, Blache D. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. Anim FeedSciTech.2012;176:150-162.
6. Sánchez C. Evolution, strengths and weaknesses in regulation of natural herbal medicine. Bases for new products. J Pharm Pharmacogn Res. 2015;3(suppl.1):S86.
7. Arencibia DF, Rosario LA, López Y, Fariñas M, Infante JF, Díaz D, et al. Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda. Retel. 2009;22:1-15.
8. OECD. Guide ENV/JM/MONO(99)23. 1999. Disponible en: <http://www.oecd.org>.
9. Olfert DE, Brenda M, Ann M. Guide to the care and use of experimental animals, Second Edition. 1993; 1-174.
10. OECD. Guide N° 423. 2001. Disponible en: <http://www.oecd.org>.
11. Fernández-Calienes A, Mendiola J, Monzote L, García M, Sariego I, Acuña D, et al. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. Rev Cubana MedTrop. 2009;61(3):254-258.
12. Paixão A, Mancebo B, Sánchez LM, Walter A, Arsénio AM, Soca Metal.

- Tamizaje fitoquímico de extractos metanólicos de *Tephrosia vogelii* Hook, *Chenopodium ambrosoides*, *Cajanus cajan* y *Solanum nigrum* L. de la provincia de Huambo, Angola Rev Salud Anim. 2014;36(3):164-169.
13. Belmain SR, Amoah BA, Nyirenda SP, Kamanula JF, Stevenson PC. Highly Variable Insect Control Efficacy of *Tephrosia vogelii* Chemotypes. J Agric Food Chem. 2012;60:10055–10063.
 14. Stevenson PC, Kite GC, Lewis GP, Forest F, Stephen P, Nyirenda SP et al. Distinct chemotypes of *Tephrosiavogelii* and implications for their use in pest control and soil enrichment. Phytochemistry. 2012;78:135-146.
 15. Githiori JB, Höglund JM, Waller PJ, Baker RL. The anthelmintic efficacy of the plant, *Albizia anthelmintica*, against the nematode parasites *Haemonchusc ontortus* of sheep and *Heligmosomoides polygyrus* of mice. Veterinary Parasitology. 2003;16:23-34.
 16. Jain A, Nahata A, Kumara A. Effect of *Tephrosia purpurea* (L.) Pers. Leaves on Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. Sci Pharm. 2013;81:1071-1087.