



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

DEPARTAMENTO DE FARMACIA
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

TÍTULO

Evaluación toxicológica a los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterothoru*, L; empleando dos técnicas alternativas.

Tesis en opción al título de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas.

Autor:

Diuber Manuel García Silverio

Tutores:

Msc:Yanelys Saucedo

Msc:Esvieta Tenorio

Msc:Emilio Monteagudo

Santa Clara.
2007

EXERGO

Buena es la ciencia con herencia, y
provechosa para los que ven el sol.

Porque escudo es la ciencia, y escudo es el dinero; mas
la sabiduría excede, en que da vida a sus poseedores.

Eclesiastés 7 (11-12)

DEDICATORIA

Para todos los que me han sabido dar amor, dedicación, orientación, respeto y esperanzas, les dedicó esta etapa de mi vida:

A ti mamá, por enseñarme con carácter y coraje como enfrentar cada día,

A ti papí, pues has dedicado mucho para que yo pueda crecer,

A ti mi querida abuela, pues significas mucho para mi,

A ti mi abuelo, que eres muy importante para la felicidad de todos en la familia,

A mi hermana, tíos, tías y todos aquellos que siempre me apoyaron con su confianza, también los incluyo y disfruten conmigo el fruto de nuestro trabajo; gracias a todos.

Diuber

AGRADECIMIENTOS

Aprovecho en esta ocasión, para agradecer a todos aquellos que siempre han estado a mi lado proporcionándome su apoyo incondicional; en este momento: abuela, abuelo, mamá, papí, les agradezco por inspirarme a dar continuamente lo mejor y batallar siempre hasta el final, también a ustedes mis tíos y tías, pues siempre tuvieron en mi plena confianza y me dieron mucho apoyo emocional.

A ustedes tutores, también les doy las gracias, pues dedicaron mucho tiempo y esfuerzo para que yo pueda alcanzar este título.

Por esta nueva etapa que sin todos ustedes no hubiese podido superar, les agradezco infinitamente y les pido disfruten junto a mi.

RESUMEN

Resumen.

La investigación desarrollada persiguió ampliar los estudios toxicológicos agudos de los sólidos pulverulentos del *Parthenium hysterophorus*, L. (escoba amarga), planta que ha mostrado una notable eficacia para el tratamiento de la helmintiasis. Se conoce además que tras exposiciones sucesivas causa serios efectos tóxicos, como dermatitis por contacto, fotodermatitis y rinitis.

Para ello fueron desarrollaron dos ensayos alternativos, la toxicidad aguda oral por el método de las clases (T.C.A), para el cual fueron usadas ratas Sprague Dawley administrando dosis únicas de (50 mg/Kg, 300 mg/Kg, 2000 mg/Kg.p.v.) de la suspensión acuosa de los sólidos pulverulentos de la planta por vía oral. Los resultados obtenidos fueron los siguientes, la T.C.A oral mostró una dosis letal 50 (LD50) superior a 2000 mg/Kg, clasificándose la muestra de ensayo como no tóxica

Se evaluó el grado de irritabilidad ocular del extracto obtenido a partir de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*, L, mediante el ensayo de hemólisis con células rojas humanas (RBC), en un rango de cinco concentraciones que abarcaron desde 0.3833 mg/mL hasta de 1 mg/mL, a diferentes tiempos de exposición. La prueba de RBC con eritrocitos humanos a los diferentes tiempos de exposición permitió clasificar al extracto vegetal como muy irritante ocular.

ÍNDICE

Índice.

I	Introducción	1
II	Capítulo I Revisión bibliográfica	3
1.1	Parthenium hysterophorus, L. (escoba amarga)	3
1.1.1	Nombres comunes y sinonimia	3
1.1.2	Origen, distribución geográfica y fenología.	3
1.1.3	Descripción botánica	4
1.1.4	Composición química	4
1.1.5	Usos en la medicina tradicional	5
1.1.6	Actividades biológicas de los extractos	6
1.1.7	Reportes de toxicidad	8
1.1.8	Distribución y excreción de la partenina.	11
1.1.9	Relación estructura actividad tóxica	11
1.2	Estudios toxicológicos en la evaluación de productos naturales.	12
1.2.1	Estudios toxicológicos	12
1.2.2	Toxicología aguda. Definición	13
1.2.3	Objetivos de los estudios toxicológicos agudos	13
1.2.4	Tipos de estudios de toxicología aguda	14
1.2.5	Estudios alternativos en toxicología	14
1.2.6	Método de las clases	16
1.2.7	Estudios alternativos de irritabilidad oftálmica	16
III	Capítulo II Materiales y Métodos	19
2.1	Preparación del material vegetal	19
2.1.1	Recolección.	19
2.1.2	Secado	19
2.1.3	Molinado y tamizado.	20
2.2.	Ensayos de solubilidad de los sólidos pulverulentos del Parthenium hysterophorus, L.	20
2.2.1	Materiales y reactivos empleados.	20
2.2.2	Preparación de las soluciones de ensayo	21
2.2.3	Preparación del extracto vegetal	21
2.2.4	Procedimiento empleado en los ensayos de solubilidad.	21
2.3	Experimento I. Evaluación de la irritabilidad oftálmica del extracto obtenido a partir de los sólidos pulverulentos de Parthenium hysterophorus, L: empleando el ensayo alternativo de hemólisis con células rojas humanas.	21
2.3.1	Justificación y selección del método	21
2.3.2	Características del sistema de estudio.	22

2.3.3	Variables a medir.	22
2.3.4	Sistema de identificación.	22
2.3.5	Aislamiento y preparación de las células rojas	22
2.3.6	Preparación del extracto	23
2.3.7	Diseño experimental	23
2.3.8	Interpretación de los resultados.	26
2.4	Experimento II. Evaluación de la toxicidad aguda oral por el Método de las Clases.	26
2.4.1	Justificación para la selección del sistema de estudio	26
2.4.2	Caracterización del sistema de estudio	27
2.4.3	Variables a medir.	27
2.4.4	Alojamiento y Cuarentena	27
2.4.5	Sistema de Identificación.	28
2.4.6	Preparación de la suspensión de los sólidos pulverulentos del <i>Parthenium hysterophorus</i> , L.	28
2.4.7	Tratamiento.	29
2.4.8	Diseño experimental.	29
2.4.9	Resultados	30
IV	Capítulo III Resultados Discusión	31
3.1	Resultados y discusión.	31
3.1.1	Ensayos de solubilidad de los sólidos pulverulentos del <i>Parthenium hysterophorus</i> , L	31
3.1.2	Evaluación de la irritabilidad oftálmica del extracto obtenido a partir de los sólidos pulverulentos de <i>Parthenium hysterophorus</i> , L. empleando el ensayo alternativo de hemólisis con células rojas humanas. 29	31
3.1.3	Evaluación de la toxicidad aguda oral por el Método de las Clases	35
V	Conclusiones	36
VI	Recomendaciones.	37
VII	Bibliografía.	38
VIII	Anexos	

INTRODUCCIÓN

Introducción.

El mundo actual globalizado ha obligado que países desarrollados y subdesarrollados elaboren alternativas asequibles a sus medios en el campo de la medicina, una de estas es el uso de la medicina tradicional herbolaria, la cual posee una incontable fuente de conocimientos y experiencias logradas en el transcurso del tiempo que pueden ser aún más aprovechadas por el hombre actual para equilibrar un poco más las necesidades y dependencias que asume esta sociedad con los medicamentos.⁽¹³⁾

En Cuba la práctica de la medicina tradicional herbolaria, se ha ido fomentando e incrementando en las últimas décadas para dar soluciones y alternativas a fortalezas y amenazas que existen en nuestro país vinculadas a los medicamentos; el alto costo de las materias primas para la producción de estos, las reacciones adversas de los mismos unido a que nuestro país es rico en diferentes especies de plantas medicinales y que estas pueden ser más inocuas en comparación con los medicamentos convencionales a conllevado a que los productos naturales obtenidos a través de plantas, sean motivo de numerosas investigaciones en nuestro país.

La inocuidad de los productos naturales con relación a los medicamentos de origen sintético, no exime que los mismos estén carentes de toxicidad, por lo cual se recomienda realizar una evaluación toxicológica exhaustiva, etapa fundamental en la ruta crítica para el desarrollo de los medicamentos, siendo ésta en los momentos actuales muy costosa.⁽⁴⁴⁾

En la actualidad la incidencia de las intoxicaciones es prácticamente desconocida, sin embargo cabe reconocer que cada año aparece un alto índice de muertes en personas a consecuencia de diversos envenenamientos, entre ellos los causados por toxinas naturales.⁽¹¹⁾

Las agencias regulatorias internacionales como la EPA, OECD y la FDA son muy exigentes en la ruta crítica para la evaluación de la seguridad de estos productos, implementándose diversos ensayos convencionales para la evaluación de la toxicidad de las sustancias lográndose una armonización en cuanto a normativas. Pero estas pruebas se consideran agresivas para los animales ocasionándoles estrés y dolor, por lo que ha surgido un nuevo movimiento protector de los animales de laboratorio que ha posibilitado la introducción y validación de técnicas

alternativas dirigidas al refinamiento, reducción y reemplazo de los ensayos toxicológicos clásicos. ^{(59), (61), (63)}

El desarrollo de los métodos alternativos ha posibilitado la introducción de marcadores más sensibles, específicos y de bajo costo, además en muchos casos no emplean animales de laboratorio.

Es por ello que la presente investigación, persigue unirse a las nuevas soluciones elaboradas en el campo de la toxicología, con la realización de dos ensayos alternativos a los sólidos pulverulentos de el *Parthenium hysterophorus*, L. planta que se ha sometido a investigaciones analíticas, tecnológicas y toxicológicas desde hace algunos años en el Departamento de Farmacia de la UCLV, con vistas a la futura elaboración de formas sólidas de dosificación de uso antiparásito. Atendiendo a lo anteriormente planteado, se proponen los siguientes objetivos:

Objetivo General:

1. Desarrollar estudios de toxicología alternativos a *Parthenium hysterophorus*, L. (escoba amarga).

Objetivos específicos

1. Desarrollar el test de (C.T.A.) ó Método de las clases a los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*, L.

2. Evaluar el grado de irritabilidad ocular del extracto obtenido a partir de los sólidos pulverulentos de la planta, mediante el test RBC (hemólisis de células rojas), empleando eritrocitos humanos como modelo in vitro.

CAPÍTULO I

Revisión bibliográfica.

1.1 *Parthenium hysterophorus*, L. (escoba amarga)

1.1.1 Nombres comunes y sinonimia.

Parthenium L, *El Parthenium* Smith Compositae del *pelitre*, quinina silvestre *hysterophorus* L. sin de *Parthenium*. *Parthenium de Tanacetum* (L.), mala hierba de la zanahoria, mala hierba de la estrella, feverfew, tapa blanca, chandani del chatak, mala hierba amarga, ramphool, garghas. (2), (7), (8), (9), (10)

1.1.2 Origen, distribución geográfica y fenología.

Es una planta oriunda de América tropical; presentó una entrada accidental a mediados de los años cincuenta en la India y ahora se considera como una de las especies más nocivas en ese país.

Dicha maleza es anual y puede encontrarse durante todo el año a lo largo de todo el país diseminada en orillas de caminos, potreros, vías de ferrocarril y en campos cultivados, sobre suelos neutros y ácidos. Suele divisarse en terrenos llanos arcillosos, principalmente en los suelos rojos, con mayor frecuencia en otoño e invierno.

Sus semillas no germinan inmediatamente después de la maduración, pues primeramente los aquenios deben dispersarse y liberar algunos inhibidores de la germinación. La planta llega a su etapa óptima de germinación dentro del primero y sexto mes después de la maduración de los aquenios. A su vez se hace indispensable para la germinación de las semillas que estas se encuentren al menos cinco centímetros por debajo del suelo.

La planta florece desde los 30 a 45 días después de la germinación y su ciclo comprende alrededor de los 5 meses, produciendo un número de 820 cabezuelas florales por planta.

Se conoce que su población puede disminuir si se escarda durante sus estadíos tempranos para evitar la propagación de las flores además de realizar un proceso de arado profundo en los terrenos a cultivar y en zonas de cultivos infestadas. (1), (4), (2), (3), (5)

1.1.3 Descripción botánica.

El *Parthenium hysterophorus*, L. pertenece a la familia Compositae o Asteraceae, la cual es erecta con un tamaño de 1 a 1,5 metros de alto, sus tallos por lo general son ramificados, estriado, estrigoso con hojas que al principio de su crecimiento forman una roseta basal; las hojas del tallo son alternas, pecioladas, de 20 a 30 cm. de largo, pinnada a bipinnadamente divididas en segmentos lineares a lanceolados, subagudos en el ápice, con pubescencia similar a la de los tallos, las inflorescencias poseen cabezuelas dispuestas en panículas cimosas por lo general laxas y muy ramificadas, que sobresalen del follaje.

Sus cabezuelas poseen involucre anchamente campanulado de 2 a 3 mm de largo, brácteas exteriores de 5 cm., elíptico-ovadas o elíptico-abobadas, con pelos en el ápice, persistentes, las brácteas interiores son suborbiculares, sin pelos, que caen con los aquenios; poseen receptáculo hemisférico, sus páleas son de hasta 1.5 mm de largo, ensanchadas y pubescentes en el ápice, las cabezuelas exteriores se vuelven corchosas, en forma de capucha. Las flores son liguladas con láminas de menos de 1 mm de largo, truncados ó emarginados en el ápice; posee flores aproximadamente 60 del disco, las corolas tienen casi 1,5 mm de largo, angostamente infundibuliforme, sin pelos. Los aquenios de las flores liguladas oblongos a obovados, de casi 2 mm de largo, negruzco, con o sin pelos, vilano de 2 escamas petaloídes de 5 a 7 mm de largo. ^{(6), (11), (7), (12), (13)}

1.1.4 Composición química.

El análisis químico ha indicado que todas las partes de la planta incluyendo el polen contienen toxinas llamadas lactonas sesquiterpénicas como la himenina, damsina, ambrosina, hysterina, caryofilina, coronofilina y partenina, también posee limoneno y pineno que pertenecen a la familia de los monoterpenos. ^{(10), (13)}

Las hojas poseen esteroides tales como estigmasterol, citosterol, campesterol; alcaloides; carbohidratos; amino-ácidos; alcanos; lípidos; aceites esenciales; derivados de flavonoides como la quercitrina, quercetagina, quercetina, kaempferol y algunos compuestos inorgánicos como Ca, Fe, Mn, Cu, Zn, K, Na, Mg, Cd, Pb. ^{(15), (17)}

Los componentes principales de su carácter tóxico son la partenina y ácidos fenólicos tales como ácido cafeico, ácido vanillico, ácido ansico, ácido p-anísico, ácido clorogénico y ácido parahydroxybenzoico, mortal a los seres humanos y a los animales. ^{(15), (16)}

1.1.5 Usos en la medicina tradicional.

La palabra *Parthenium* se deriva del *parthenice* que en latino sugiere sus aplicaciones medicinales. En el sistema de Homeopatía, las alergias causadas por *Parthenium* se pueden tratar con una droga preparada del *Parthenium* además en Finlandia una infusión de *Parthenium* es utilizada para la consumación. ^{(4), (17)}

En el diccionario de plantas económicas de la India se describe el *Parthenium* como una mala hierba y se divulga para ser utilizado como tónico, febrífugo, y emenagogo. La decocción de la raíz es útil en la disentería. Un grupo de investigadores demostró que dosis subletales de la partenina exhibieron actividad antitumoral en ratones y que la droga podría curar totalmente a ratones o aumentar su tiempo de supervivencia después de que hubieran sido inyectados con las células de cáncer. El *Parthenium* también se divulga como remedio prometedor contra amebiasis hepática. Los indios americanos del sur utilizan la decocción de raíces para curar la disentería amébrica, mientras que la partenina una toxina del *Parthenium*, es un metabolito activo contra la neuralgia y ciertos tipos de reumatismo.

El *Parthenium* se utiliza como remedio popular en el Caribe y la América Central, para desórdenes de la piel, aplicándose externamente. La decocción de la planta se toma a menudo internamente como remedio para una variedad amplia de dolencias. En Jamaica la decocción se utiliza como pulga-repulsivo para los perros y otros animales.

Los siguientes usos están basados en la tradición, teorías científicas o investigación limitada, pues no se han probado completamente en humanos además no siempre se ha demostrado su seguridad y eficacia. Algunas de estas afecciones son potencialmente serias y las debe evaluar un proveedor médico calificado. Existen también otros usos propuestos que no están señalados a continuación, tales como dolor abdominal, anemia, antiangiogénico, antiinflamatorio, asma,

dilatación de los vasos sanguíneos (relajamiento), cáncer de seno, cáncer, enfermedades del sistema nervioso central, resfríos, estreñimiento, diarrea, digestión, mareo, fiebre, dolor en las articulaciones, inducción de parto/aborto, lesión del músculo cardíaco, picadas de insectos, repelente de insectos, leishmaniasis, leucemia, calambres menstruales, complicaciones neurológicas de la malaria, cáncer de páncreas, promoción de la menstruación y trastornos uterinos.

Los siguientes usos que se describen a continuación se han sometido a prueba en humanos o animales, no siempre han demostrado seguridad y eficacia por lo que se debe evaluar un proveedor médico calificado.

Otros estudios se han realizado para demostrar sus efectos beneficiosos como antiinflamatorio e hipoglicemiante dando resultados prometedores. ^{(2), (6), (7), (13)}

1.1.6 Actividades biológicas de los extractos.

Se conoce a través de numerosas publicaciones que los extractos elaborados con la planta poseen una gran variedad de actividades biológicas dentro de las que pueden citarse:

Se realizó un estudio in vivo en ratas con el objetivo demostrar las propiedades antiamebiásicas de la partenina aislada comparándola con un grupo control, el cual fue el metronidazol donde quedó esclarecido que la dosis óptima es de 40 mg/Kg. de peso pues a dicha dosis el % de letalidad fue de 0 y hubo un 50 % de cura en los animales. ⁽⁶⁸⁾

En la India, el aceite a concentraciones no especificadas, demostró actividad antibacteriana en *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Klebsiellas species*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonellas newport*, *Staphylococcus aureus* sobre placas de agar, dicha actividad se debe a pyrethrins sustancia reportada en la planta a un 0.14 %. ⁽¹⁷⁾

La partenina aislada de *Parthenium hysterophorus*, L. demostró que a dosis subletales exhibe actividad antitumoral en ratones y este ratifica que la droga pudiera curar los ratones completamente o aumentar su tiempo de supervivencia después de ser inyectados con células de cáncer. ⁽¹⁸⁾

Se realizaron estudios in vivo para demostrar la actividad antiparasitaria usando como modelo animal rumiantes, para ello se elaboraron extractos de las partes verdes de la planta, dando como resultado que el producto tiene una buena efectividad contra nemátodos hematófagos de los rumiantes, que se localizan a nivel de cuajar. ⁽¹⁹⁾

El extracto metanólico de la flor del *Parthenium hysterophorus*, L. posee actividad antitumoral en hospederos tratados con leucemia linfocítica. Observándose que el tamaño del tumor y esparcimiento del mismo tuvo tendencia a disminuir, así como la supervivencia de los portadores de leucemia linfocítica a aumentar. El efecto del extracto fue establecido por las autopsias bioquímicas, utilizando marcadores tales como: contenido de citocromo P-450, transferasa glutatión y UDP- glucuronil transferasa en los tejidos de las células hepáticas. ⁽²⁰⁾

Se evaluó la actividad tripanocida “in vitro” del extracto etanólico de las flores de *Parthenium hysterophorus*, L., mostrando 100% de actividad tripanocida en las cuatro concentraciones ensayadas 5, 50, 500 y 1000 mg/mL. Sin embargo las pruebas in vivo revelaron que el extracto muestra efecto antitripanocidal a dosis de 100 y 300 mg/Kg., por vía intraperitoneal, comparado contra un grupo control. ⁽²¹⁾

Un grupo de investigadores cubanos prepararon el extracto acuoso del *Parthenium hysterophorus* L. para realizar un estudio químico – físico preliminar del mismo, con el propósito de lograr una materia prima útil para formular fitofármacos. El extracto obtenido se utilizó para elaborar dos formulaciones, un champú y una loción, que combinados se aplicaron en perros afectados por escabiosis, lográndose notables mejorías sin reacciones adversas en estos animales tras una sola aplicación. Además este grupo de investigadores sugiere la necesidad de continuar el estudio farmacológico en modelos experimentales adecuados, con el objetivo de obtener datos precisos de su actividad en esta y otras patologías. ⁽²²⁾

Para el tratamiento de la escabiosis el profesor Pedro Regalado Ortiz González, primer dermatólogo de las Fuerzas Armadas Revolucionarias, propone utilizar las formulaciones de fitofármacos sólo bajo prescripción facultativa y por un período de solo 5 noches seguidas. Según este investigador una formulación magistral sería una loción con alcohol a 80%, extracto fluído de hojas y flores de escoba amarga y agua destilada para 100 mL. ⁽²³⁾

1.1.7 Reportes de toxicidad.

El *Parthenium* también puede producir brotes alérgicos ya sea por contacto directo e indirecto con esta planta, pudiéndolo causar en las personas alérgicas al crisantemo, las margaritas, la flor de la caléndula y otros miembros de la familia de las compuestas, incluida la ambrosía. Existen múltiples reportes de brotes alérgicos en la piel como dermatitis que después de una larga exposición se vuelven crónicos. La causante de esta epidemia se considera que sean las lactonas sesquiterpénicas, ya que al desarrollar la planta el polvo fino es arrastrado por el viento y provoca esta patología.^{(24), (25), (26)}

Por otra parte se investigó una población de pacientes con dermatitis por contacto producida por plantas de la familia Compositae, utilizándose un grupo control. Para esto fueron usados ensayos de parche con extractos etanólicos de cuatro plantas de esta familia. Dando como resultado que el 98 % de los casos fueron positivos al ensayo del *Parthenium*.^{(29), (30), (31)}

Se sometió a estudio un grupo de personas que sufren dermatitis alérgica causada por contacto directo con la planta y se evidenció un retraso en la reacción inmunológica a la partenina. La investigación se realizó a través de un ensayo donde se determinó la sensibilidad cruzada entre cuatro miembros de la familia Compositae, ensayando 63 pacientes clínicamente diagnosticados con dermatitis por contacto y 51 controles. En este caso fueron conducidas pruebas de parche con cantidades medidas de extractos de materiales vegetales, entre los que se encuentra la planta en estudio. Se obtuvo como resultado que la hipersensibilidad tuvo valores que variaron ampliamente con cada planta en diferentes pacientes, además no se mostró paralelismo entre la hipersensibilidad con varias de ellas.⁽³⁵⁾

Otro documento describió que toros y búfalos desarrollaron severas dermatitis a concentraciones no especificadas de la planta, en tanto que las autopsias revelaron ulceración en el tracto alimentario y extensivos cambios patológicos en hígado, riñón y piel.^{(42), (43)}

Otra de las manifestaciones tóxicas que ha sido reportada es la rinitis alérgica. Esta se evidenció mediante una investigación realizada en 2035 personas residentes en Bangalore, la que reveló que el 7.1 % de la población sufre esta patología debido a la exposición al polen de la planta. Una población de 1294 pacientes que padecieron de alergia naso-bronquial durante los 4 años

anteriores, se les realizó pruebas en la piel demostrando que el 42.5 % eran sensibles al polen de la planta. También mediante ensayos de ELISA fue corroborada la presencia de IgE e IgG en el suero de los pacientes. ⁽³⁷⁾

Un estudio clínico realizado para demostrar la incidencia del polen en la población mostró que el 34 % de los pacientes sufren rinitis y el 12 % presenta asma bronquial, dando positiva la reacción en la piel al extracto del polen. Además fue detectada IgE en 16 de 24 pacientes que sufren rinitis (64). También se ha localizado en la superficie del grano del polen un alergeno identificada como glucoproteína 31 KD la cual fue purificada, caracterizada inmunológicamente y determinada su secuencia la cual demostró ser responsable de la alta incidencia de esta manifestación. ^{(39), (40), (29)}

Previo al desarrollo de este trabajo se han llevado a cabo estudios de irritabilidad dérmica primaria, oftálmica y toxicidad aguda dérmica de los sólidos pulverulentos. Para la evaluación de la irritabilidad dérmica y oftálmica fueron utilizados conejos albinos a los cuales se les aplicaron 0,5 g y 0,1g de los sólidos pulverulentos obtenidos de la planta. El estudio de toxicidad aguda dérmico se realizó empleando el método de las Clases de Toxicidad Aguda (CTA). En este caso se emplearon ratas Wistar a las cuales se le aplicó una dosis de 2000 mg/Kg. del mismo producto. Los resultados mostraron la ausencia de efectos irritantes tras su aplicación sobre la piel intacta de conejos albinos y las lesiones observadas en sus ojos fueron ligeras y reversibles. Se calcularon los índices de irritación en cada caso, obteniéndose valores de 0 y 7,33 respectivamente, por lo que la planta se evalúa como No irritante dérmica y oftálmica. Por su parte el estudio de toxicidad aguda demostró la ausencia de efectos tóxicos relacionados con su aplicación dérmica, por lo que su LD₅₀ es mayor de 2000 mg/Kg. y se evalúa como No clasificado (no tóxico). ⁽²⁸⁾

También fue desarrollado un estudio in vivo de tres días para determinar el potencial de irritabilidad ocular de la planta en forma terminada de champú, para el cual se utilizó conejos a los que se le aplicó 1 mL de la formulación en cada ojo. Pasados los tres días, el estudio concluyó clasificando la formulación como moderadamente irritante ya que la misma posee un 9 % de detergente y los daños observados en el tejido ocular disminuyeron gradualmente por lo que argumentan la posibilidad de su uso como champú. ⁽⁸⁹⁾

Otro estudio donde fue caracterizada la partenina, evaluó la letalidad de diferentes fragmentos obtenidos durante la purificación de el principio tóxico del *Parthenium hysterophorus*. Para ello fue usado como modelo animal ratas, donde la dosis que trajo aproximadamente 50 % mortalidad (LD50) fue de 42mg/Kg. de peso, determinándose por el método de clásico así como por el método del [probit].⁽³²⁾

También fue reportada la realización de un estudio toxicológico agudo con el extracto metanólico del *Parthenium hysterophorus* en conejos, durante una corta exposición (21 días) para evaluar el grado de toxicidad a diferentes niveles de órganos y tejidos. Donde se midieron algunos parámetros bioquímicos, hematológicos y del suero. Los resultados mostraron una relativa leucocitosis, linfocitosis y neutropenia en las diferentes muestras de sangre obtenidas durante las etapas del estudio; también presento aumentado en el suero el nivel de creatinina y alteraciones en la actividad y concentración de algunas enzimas. Llegando a la conclusión de que el extracto resultó hepatotóxico, nefrotóxico y mostró reacciones adversas en el sistema hematopoyético en los conejos.^{(33), (34)}

Mediante técnicas de ELISA se evaluaron a 22 pacientes residentes en la costa del golfo de EUA, para la detección de IgE y se evidenció la presencia de este anticuerpo en gran número de pacientes como resultado de la exposición al polen del *Parthenium hysterophorus*.⁽³⁶⁾

En la India se piensa, que el consumo de la planta sea un posible agente causal del aumento de las concentraciones de cobre hepático durante la lactancia materna, además de influir en la agudización de la cirrosis hepática infantil.⁽⁴¹⁾

Según el Compendio de Plantas Medicinales de la India describe el daño inducido por la partenina a dosis-dependiente en los cromosomas de leucocitos humanos a través de un ensayo in vitro y formación de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de ratones.^{(44), (45)}

A su vez esta demostrado que la partenina interfiere en la fosforilación oxidativa, inhibiendo el estadio 3 de la respiración y estimulando el estadio 4 en mitocondrias de células hepáticas con actividad similar a la que refiere la enzima ATPasa en presencia de iones Mg, esto pudiera estar muy vinculado con su efecto tóxico en los diversos organismos expuestos a esta planta.⁽⁴⁶⁾

Por último se determinó que la partenina es un antígeno incompleto del *Parthenium*, que al interactuar con la dermis se une a proteínas plasmáticas como la albúmina en presencia de radiaciones ultravioletas, pasando entonces a convertirse en un antígeno completo, lo que explica que existe una reacción antígeno-anticuerpo que cause fotodermatitis. Por lo que la exposición directa y combinada de *Parthenium hysterophorus* con radiaciones solares produce reacciones de hipersensibilidad y diferentes tipos de lesiones en la piel a las personas expuestas, las cuales son más agudas en las zonas que tengan un mayor contacto con el sol. ^{(49), (36), (48)}

1.1.8 Distribución y excreción de la partenina.

La distribución y excreción fue medida por radioactividad del marcador [3H parthenin] en orina, heces fecales, leche y sangre de cerdos de guinea y vacas, dando como resultados que la distribución tanto por vía oral y parenteral tuvo su máximo a las 72 horas en riñón y bilis con una vida media en sangre de 8 horas, donde la acumulación de la toxina fue mayor en los riñones. En tanto la excreción por ambas vías de administración aportó diferentes resultados. Por vía oral en orina fue después de 5 horas, en la leche a la hora y en heces fecales al cabo de 7 horas, sin embargo por vía parenteral en la orina fue pasado 30 minutos, por las heces no se obtuvo una cantidad significativa y en la leche se mantuvo con el mismo valor de 1 hora. ⁽¹⁹⁾

1.1.9 Relación estructura actividad toxica de la partenina.

La posible explicación de que las lactonas sesquiterpénicas constituyen una clase importante de sustancias que causan dermatitis alérgica por contacto en el ser humano, se puede explicar a través de la partenina su principal agente etiológico, la cual posee dos sitios potencialmente activos, un metileno (C- 13) en un anillo exocíclico y un doble enlace C-2, C-3 alílico a un grupo carbonílico lo que demuestra su efecto tóxico y potente actividad inmunoquímica. ⁽²⁷⁾

1.2 Estudios toxicológicos en la evaluación de productos naturales.

1.2.1 Estudios toxicológicos.

Los estudios de toxicidad constituyen hoy día una parte muy importante dentro del desarrollo de un nuevo fármaco y se extienden prácticamente a lo largo de todo el mismo, el objetivo de los mismos es evaluar el riesgo o peligro potencial que un agente químico o físico puede ocasionar sobre la salud humana cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas. Los estudios toxicológicos no se limitan sólo a los fármacos sino que la mayor parte de las sustancias químicas (pesticidas, agroquímicos, cosméticos, plásticos, etc.)

Podría definirse la toxicidad como el estudio cualitativo y cuantitativo de los efectos deletéreos ocasionados por agentes químicos o físicos sobre la estructura y función de los sistemas vivos y la aplicación de estos estudios para la evaluación de la seguridad y la prevención de daños al hombre y a las formas de vida útiles. El término cualitativo se refiere al tipo de órgano diana afectado, en comparación con otras sustancias conocidas, mientras que el término cuantitativo se refiere a la relación dosis-respuesta. ^{(51), (53)}

Ya en el siglo XVI, Paracelso afirmaba que "todas las sustancias son tóxicas y ninguna sustancia es tóxica, solo la dosis determina la toxicidad". En cualquier caso, los estudios de toxicidad están diseñados para obtener la mayor información posible sobre los efectos adversos que pueden tener lugar bajo exposiciones normales o accidentales. ^{(52), (56)}

En general, para administrar un fármaco son preceptivas las pruebas siguientes: toxicidad aguda por dos vías de administración y al menos en dos especies animales; toxicidad subaguda en dos especies animales y vía de administración considerada en humanos, en una etapa de 2 a 4 semanas; toxicidad subcrónica usando dos especies animales y vía de administración considerada en humanas en un período de 13 semanas y 1 semana de recuperación; toxicocinética con una o dos especies de 2 a 4 semanas; toxicidad crónica usando dos especies animales con vía de administración considerada en humanos, entre 6 meses y 1 año y 4 semanas de recuperación; carcinogénesis en dos especies animales rata y/o ratón por vía de administración oral, entre 18 meses y 2 años; teratogenia con dos especies animales rata y conejo , vía de administración

considerada en humanos, la administración del fármaco durante la gestación; fertilidad de una especie animal en ratas ya sea en machos o hembras a través administración antes y después del apareamiento; toxicidad peri - y post-natal; mutagénesis usando test de sistemas bacterianos con o sin activación microsomal añadiendo además los estudios previos (dosis-respuesta finding studies) para determinar las dosis, en particular al inicio de los estudios de toxicidad subaguda, cuando se añade el fármaco a la dieta, estudios de teratogenia y fertilidad y algunos de los tests mutagénicos. Adicionalmente, según el tipo de fármaco, pueden ser necesarios algunos test adicionales como son: toxicidad por inhalación, irritación ocular, irritación dermal, irritación intravenosa, intraarterial o perivenosa, fototoxicidad, etc. ^{(53), (54), (55), (56)}

1.2.2 Toxicología aguda. Definición.

Actualmente existen diversos conceptos para definir toxicología aguda, dictados por diferentes centros científicos y órganos regulatorios donde el más completo y abarcador lo define la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD), el cual lo dicto como: Capacidad de una sustancia para producir efectos adversos dentro de un corto plazo de tiempo (usualmente hasta de 14 días) después de una administración única o tras dosis o exposiciones múltiples dentro de 24 horas. ⁽⁵⁶⁾

La toxicidad aguda determina los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal; la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50, que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50 % de los animales. La observación de los animales se lleva a cabo después de la administración de la sustancia y dura hasta 14 días, después de los cuales los animales son eutanaciados y autopsiados. En general, el test se realiza con 5 grupos de 10 animales de cada sexo, aunque existen algunos métodos abreviados que intentan reducir el número de animales a sacrificar. La determinación de la DL50 se suele llevar a cabo en rata y ratón por al menos dos vías de administración entre las cinco posibles (i.v., i.m. ip. s.c. y oral). ^{(54), (55)}

1.2.3 Objetivos de los estudios toxicológicos agudos.

Los estudios de toxicidad aguda están encaminados a lograr los siguientes objetivos:

1. Demostrar cualitativamente la dosis letal 50 (DL50) con sus máximos y mínimos.

2. Clasificar la sustancia en estudio.
3. Valorar los principales síntomas que caracterizan la intoxicación aguda.
4. Identificar y demostrar las principales lesiones anatomopatológicas en el ó los órganos dianas que caracterizan la intoxicación de la sustancia a estudiar.
5. Demostrar relación letalidad contra tiempo.
6. Determinar susceptibilidad entre sexo y reversibilidad del daño tóxico producido.

Atendiendo a lo anteriormente planteado, dichos estudios se han clasificado infinidad de ocasiones como la primera línea de defensa cuando existe ausencia de datos para estudios a largo plazo, ya que a través de ellos se puede clasificar, rotular e incluso brindar información sobre los posibles mecanismos de toxicidad y relación estructura actividad para algunos compuestos químicos.^{(53),(51),(58)}

1.2.4 Tipos de estudios de toxicología aguda.

La toxicología aguda esta compuesta por un número de ensayos diferentes y en ella se debe usar más de una vía de administración ya que los resultados que se obtiene con este tipo de estudio son fundamentales para establecer la evaluación toxicológica de cualquier producto químico o farmacéutico que desee salir al mercado.

Su batería de ensayos se divide en evaluaciones de toxicidad aguda dérmica, ocular, oral, por inhalación, exposiciones agudas pre- neonatal y neonatal, fototoxicidad, sensibilización dérmica y los de irritabilidad dérmica y oftálmica.

Todos estos estudios son de suma importancia, siendo los ensayos de toxicidad aguda oral, dérmica e irritabilidad dérmica y oftálmica imprescindibles para comenzar dichas investigaciones, e incluso podrían ser suficientes en algunos casos para dirigir los horizontes y propósitos regulatorios, así como la clasificación de productos químicos y su rotulado.^{(57), (54), (55)}

1.2.5. Estudios alternativos en toxicología.

Los métodos utilizados en la investigación, evaluación de la seguridad y toxicidad están en continuo progreso ya que los científicos están en permanente búsqueda de posibles alternativas

que mejoren la calidad de su trabajo. Ello es debido en parte a la lógica evolución de los conocimientos científicos y de sus aplicaciones tecnológicas, e incluyendo también las consideraciones éticas, logísticas, económicas, sociopolíticas y legales.^{(59), (60), (61)}

Los tres principios básicos que según Russell y Burch (1959) identifican el amplio concepto de métodos alternativos, conocidos además por las "tres RRR", significan el reemplazo de los procedimientos que emplean animales por otros que no lo precisen, la reducción en el número de animales utilizados y el refinamiento de los métodos usados para mejorar su eficacia o disminuir el dolor o sufrimiento infligido.^{(61), (62), (63)}

Las posibles alternativas comprenden tratar de evitar la repetición innecesaria de experimentos in vivo e in vitro a través de:

1. Protocolos y estudios previos para brindar disponibilidad de la información, intercambio, flexibilidad y estrategias integradas.
2. Insertar el uso modelos matemáticos de predicción como los de relación cuantitativa estructura actividad (QSAR).
3. Mejoras en el diseño con la minimización del dolor, estrés y reducción del número de animales.
4. Así como el uso de organismos inferiores y otras que incluyen estudios en humano de forma voluntaria, epidemiológicos, de vigilancia, modelos mecánicos en sistemas audiovisuales y simulaciones por ordenador y realidad virtual.

Actualmente con toda esta nueva revolución dentro del campo de la toxicología los estudios de toxicidad aguda también han sido mejorados teniendo en cuenta la primicia del concepto de las tres RRR, ejemplo de esto son: la Prueba Límite, método diseñado por la Sociedad Británica de Toxicología; el método de Up and Down o sube y baja creado por la OECD en 1998; la de Dosis Fija o FDP elaborado también por la OECD en 1992 y el Método de las clases o CTA donde todos ellos forman parte de la batería de ensayos encaminados a determinar la toxicidad aguda

por vía oral .Este último método, será utilizado para dar continuidad a la evaluación de la toxicidad de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*.^{(64),(65),(66),(87)}

1.2.6 Método de las clases:

La técnica fue descrita por Roll y se adoptó en 1996 en la guía No.423 de la OECD como una de las alternativas a la prueba clásica aguda, posteriormente se sometió a una exhaustiva revisión donde fue validado.

Se describe como una metodología por pasos o niveles de dosis donde se usan 3 animales de un mismo sexo para cada nivel y en dependencia de la mortalidad o el estatus moribundo se prosigue al siguiente paso, siendo necesaria generalmente, de 2 a 4 pasos. El método determina biométricamente la clasificación tóxica de una sustancia a través de dosis fijas separadas adecuadamente, todo esto según el Sistema Global Armonizado y utiliza 90 % menos de animales que los de LD₅₀.

Para su validación se integraron nueve laboratorios de cinco países usando para esto un número de veinte sustancias y como modelo animal ratas aunque también es posible usar otras especies de roedores.^{(67), (56), (13), (83), (84), (85), (86)}

1.2. Estudios alternativos de irritabilidad oftálmica.

Existe otro gran número con una diversas baterías de ensayos dirigidos a evaluar los diferentes tipos de estudios de toxicidad aguda como los usados para evaluar la irritabilidad oftálmica, derivados todos de la clásica prueba Draize, donde cada uno persigue un objetivo preciso y específico muy estrechamente vinculado al reemplazo,

refinamiento y reducción de animales, dividiéndose estos en una amplia gama de ensayos in vitro e in vivo dentro de los que podemos encontrar^{(69),(70),(71),(72),(73),(88)} :

1. Pruebas basadas en cultivos celulares.
2. Pruebas basadas en cultivo de órganos
3. Otros procedimientos.

1. Los ensayos basados en cultivos celulares usan diversos tipos de células vivas entre las que podemos encontrar células fibroblásticas, células corneales y muchas otras de origen humano o animales inferiores. Estas pueden ser pruebas a corto plazo que tienen períodos de exposición de 4 horas o pruebas a largo plazo con períodos de exposición de 4 horas a 7 días cultivadas y tratadas con un volumen de concentración del material de prueba. Generalmente se ha considerado como clasificación final de su acción la muerte o daño celular. Dentro de esta categoría podemos encontrar^{(69), (74), (77)}:
 - Test citotóxicos: Cultivos de células de hepatoma humano Hep G2, fibroblastos murinos Balb/C 3T3, células epiteliales de la córnea del conejo, macrófagos murinos, etc.
 - Separación celular, Test de inhibición del crecimiento y eficiencia de la clonación: Cultivo de fibroblastos renales de bebes hámster (BHK-21-C3), fibroblastos humanos tempranos (keller) y tardíos (MRC-5).
 - Test de liberación de Cr-51: Cultivo de células epiteliales corneales primarias de conejo, células SIRC, células –YAC, células P-815 tumorales, etc.
 - Ensayo con células de membrana: Cultivo de líneas celulares epitelioidales humanas (Hela y Hep2), células-LS, derivadas de fibroblastos NCTC L 925 de ratones.^{(74), (76)}
2. Las pruebas basadas en cultivos de órganos es otro grupo de ensayos muy utilizado, donde podemos citar varios ejemplos.^{(79), (28), (73), (70)}
 - Córnea aislada: En este método es aislado el tejido corneal de conejos y/o bovinos, para realizarle mediciones a nivel de la córnea, como por ejemplo opacidad, espesor, consistencia de la misma, etc.
 - Extirpación de ojos: Esta técnica se realiza para valorar efectos directos en la córnea de diferentes compuestos, en ella el material de prueba es aplicado directamente al ojo por un tiempo predeterminado y se determina efectos como opacidad e integridad del epitelio corneal. Al finalizar el estudio se realizan estudios histopatológicos a muestras obtenidas de la córnea, ejemplo de este método tenemos ojos extirpados en conejos mantenidos en una cámara de perfusión salina.

- Ileum de conejo aislado: A través de este método se han ensayado muy pocos químicos, aunque se han aportado datos de buena correlación “in vivo” para surfactantes.
- Test de la membrana corioalantoidea (HET-CAM): El material de prueba es aplicado sobre la membrana corioalantoica de un huevo de gallina fertilizado y es incubado por un período de 10 a 14 días. En este ensayo se observan y determinan efectos sobre la membrana como por coagulación de proteínas dentro y alrededor de los vasos sanguíneos, hiperanemia y hemorragia, lisis de vasos sanguíneos, etc. Muchos autores refieren que utilizando este método es posible predecir la respuesta irritante en el ojo humano.
- Otros procedimientos^{(78),(74),(79),(69)}
- Motilidad de protozoarios: en este caso la inhibición de la motilidad de la *Tetrahymena thermofila*, es tomada como indicador de toxicidad.
- Análisis cuantitativo de relación estructura-actividad (QSAR).
- Pruebas de el Parámetro: son métodos basados en célula que usan los parámetros de la siguientes , la dosis tolerada más alta (HTD); 50% inhibición de crecimiento
- (NR50, MTT50, IC50, EC50); la proporción de la recuperación celular (CRR); la retención del fluorescencia (FS-25); la proporción de viabilidad (VR-25, VR-50); 50% inducción de metahemoglobina; concentración mínima que causa el hemólisis; 50% separación celular (CD50); la disminución de proporción metabólica de células por 50% de la proporción del mando (MRD50).
- Hemólisis de células rojas de la sangre (RBC): esta prueba fue reportada por Kondo en 1970 y Pape en 1987, posteriormente en la década de los 90 fue validada por EVCAM y en la actualidad es aceptada por la agencia regulatoria internacional ISH solamente para productos naturales y cosméticos. A simple rasgo, este método correlaciona los valores de lisis de la membrana de los eritrocitos y la desnaturalización de la hemoglobina con la irritabilidad ocular que pueden producir productos que contengan sustancias tensoactivas o surfactantes, no obstante esta prueba será descrita detalladamente en el capítulo siguiente, siendo el test de elección para evaluar la irritabilidad ocular en esta investigación.^{(80),(81),(82)}

CAPÍTULO II

Materiales y métodos.

Los estudios toxicológicos fueron desarrollados en dos centros de investigación, el ensayo de toxicología aguda oral por el Método de las Clases se efectuó en la etapa comprendida del 15 de enero al 5 de febrero del 2007 en la Unidad de Toxicología Experimental (UTEX) del Instituto Superior de Ciencias Medicas de Villa Clara. El ensayo de hemólisis de células rojas humanas (RBC), realizado al extracto obtenido de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*, L fue realizado en el Laboratorio de Espectroscopía del Centro de Investigaciones Agropecuarias en la Universidad Central de las Villas en el mes de marzo del 2007.

Dichos estudios fueron realizados posteriormente de la confección de los protocolos de investigación, para lograr una optimización de los resultados obtenidos, según está establecido por entidades nacionales como Ministerio de Salud Publica (MINSAP) y Centro Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) e internacionales como Food and Drug Administration (FDA) y Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD); además de cumplir rigurosamente con los requisitos de las Buenas Prácticas de Laboratorio en toxicología experimental.

2.1 Preparación del material vegetal.***2.1.1 Recolección.***

La recolección de la planta se efectuó en su entorno natural, en las zonas aledañas al Reparto Universitario de Santa Clara, entre los meses de enero y febrero del 2007, predominando un suelo con características pardo con carbonatos.

2.1.2 Secado.

Se procedió a secar las partes aéreas de la planta excluyendo sus flores; lo cual respalda las investigaciones analíticas, tecnológicas y toxicológicas desarrolladas con anterioridad⁽²⁷⁾, empleando un material vegetal de igual composición.

El secado se realizó en una estufa MLWWLU-100 a una temperatura de 38 ° C en bandejas esmaltadas por un tiempo de 72 horas hasta lograr una pérdida de peso constante, coincidiendo estos resultados con los reportados por Hernández, M ; 2006 y Polin, L; 2006.

2.1.3 Molinado y tamizado.

Las partes aéreas secas fueron fragmentadas en un molino de cuchillas regulables, tipo Restch GMBH 5657 prototipo SR.2, el cual tiene acoplado un sistema de tamices, lo cual permitió obtener un sólido pulverulento con un tamaño de partícula de $\leq 0,5$ mm.

2.2.1 Ensayos de solubilidad de los sólidos pulverulentos del *Parthenium hysterophorus*.

Con vistas a desarrollar las pruebas toxicológicas incluidas en este estudio se realizó la evaluación de la solubilidad de los sólidos pulverulentos de la planta. Estos ensayos se llevaron a cabo en las siguientes soluciones Dimetil-sulfóxido (DMS) al 10% y solución isotónica de buffer salino (PBS) a pH 7,4.

2.2.2 Materiales y reactivos empleados.

Tabla 1. Materiales y reactivos empleados

Materiales y reactivos	cantidad
NaCL	6,78 g
Na ₂ HPO ₄	1,42 g
KH ₂ PO ₄	0,42 g
DMS (99,98%)	10 mL
H ₂ O	10 L
Balaza analítica(BOEKO)	1
Agitador de vidrio	1
Pipetas aforadas de 10 mL	3
Matraces aforados de 100 - 1000 mL	6
pH - metro (HANNA instrument)	1

2.2.3 Preparación de las soluciones de ensayo.

Preparación de la solución de DMS 10 %: Se pipeteó 10 mL de la solución de Dimetilsulfóxido al 99,98% y se añadió a un matraz aforado de 100 mL, posteriormente se procedió a completar el volumen del matraz con agua destilada y finalmente se agitó para homogenizar dicha solución.

Preparación de la solución de PBS a pH de 7,4: Se pesó 6,78 g de NaCl, 1,42 g de Na_2HPO_4 y 0,4 g de KH_2PO_4 , luego se añadió paulatinamente cada una por separado y se agitó hasta lograr una disolución total en un beaker con 950 mL de agua destilada, seguidamente se ajustó el pH de la solución a 7,4 con solución alcalina de NaOH a una concentración de 1N.

2.2.4 Preparación del extracto vegetal.

Se pesó 1 g de los sólidos pulverulentos obtenidos de las hojas y tallos de la planta, a continuación se añadió 100 mL de etanol y se agitó en máquina sacudidora (THYS-2) durante 30 minutos, seguidamente se filtró la mezcla, rotoevaporando a sequedad en un rotoevaporador tipo (BUCHI-R200). Posteriormente se calculó el % de sólidos totales, con vistas a obtener una solución de ensayo con una concentración de 1 mg/mL.

2.2.5 Procedimiento empleado en los ensayos de solubilidad.

Se pipeteó una alícuota de 10 mL de solución DMS al 10 % y se añadió a los extractos rotoevaporados, seguidamente se agitó manualmente hasta que se observó la disolución total en el solvente. Para evaluar la solubilidad de la solución de PBS se procedió de manera similar.

2.3. Experimento I. Evaluación de la irritabilidad oftálmica del extracto obtenido a partir de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*, L: empleando el ensayo alternativo de hemólisis con células rojas humanas.

2.3.1 Justificación y selección del método.

La prueba de hemólisis de Células Rojas (RBC) es un estudio in vitro de primer orden dentro de la batería de ensayos usados para cuantificar el potencial de irritabilidad ocular

de surfactantes, tensoactivos y productos detergentes sobre la membrana citoplasmática (hemólisis) en combinación con el daño a las proteínas celulares liberadas (desnaturalización), lo cual puede ser detectado sensiblemente por los cambios en la absorbancia espectrofotométrica de la hemoglobina, como indicador de ambos procesos.

Esta es una prueba simple, barata, rápida, que no necesita equipamiento especializado y usa células de fácil adquisición. Además ha sido demostrado que existe muy buena correlación entre la prueba RBC y el ensayo LEVA, HET- LEVA.

2.3.2 Características del sistema de estudio.

Se empleo células rojas humanas.

2.3.3 Variables a medir.

A_i : absorbancia correspondiente a cada concentración (540 nm).

A_{100} : absorbancia correspondiente a la hemólisis total (540 nm).

A: Absorbancia a 540 nm. Lectura de Hb (criterio de hemólisis)

A: Absorbancia a 575 nm. Lectura de Hb (criterio de hemólisis)

%Hemólisis

CH_{50} = Concentración que causa la hemólisis del 50% de los eritrocitos (mg/mL).

ID = Índice de Desnaturalización

2.3.4 Sistema de identificación.

Los tubos de ensayos fueron identificados con lápiz cristalográfico o marcador asignando un número a cada uno.

2.3.5 Aislamiento y preparación de las células rojas.

Las células rojas de sangre humana heparinizada proveniente de donantes sanos, se aislaron por centrifugación y fueron lavadas tres veces con solución de buffer salino fosfatado isotónico para eliminar trazas de plasma, células blancas y minimizar la lisis espontánea.

Las células limpias fueron suspendidas en PBS, de esta se pipeteó 50 μL y 1950 μL de agua destilada para provocar la hemólisis total de las células. Se centrifugó y se leyó la densidad óptica del sobrenadante que debe ser aproximadamente 2.0, equivalente a una concentración de 2×10^9 células mL^{-1} , (Tabla 2).

En caso de no haberse obtenido un valor de densidad óptica próximo a este valor se ajusta con PBS o se concentra la muestra con células rojas lavadas. La suspensión debe ser preparada semanalmente y se almacena a 4 °C.

Tabla 2. Lectura de la absorbancia de las muestras de eritrocitos

	muestra 1	muestra 2	muestra 3
Absorbancia	2.047	1.943	2.117

2.3.6 Preparación del extracto.

Se preparó un extracto etanólico a partir obtenido de los sólidos pulverulentos de la combinación de (hojas y tallos) de la planta, seguidamente se rotoevaporó a sequedad y se disolvió en solución de PBS a un pH de 7;4, teniendo en cuenta el cálculo del % de sólidos totales para la variante ensayada con vistas a obtener una concentración final de 1 mg/mL.

2.3.7 Diseño experimental.

I)-Determinación de la Concentración hemolítica 50 (CH_{50}).

Se prepararon diluciones seriadas del extracto a partir de la mezcla de la solución de PBS, eritrocitos y muestras en estudio, para obtener un rango de 5 concentraciones que garantizará una relación de dosis-respuestas. (Tabla 3).

Tabla 3. Preparación de las muestras para determinar la CH_{50} del extracto vegetal.

Volumen del extracto (μL)	Volumen de PBS (μL)	Volumen de Eritrocitos (μL)
487.5	1425.5	50
975	975	50
1000	900	50
1100	850	50
1950	–	50

Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 5, 30 y 60 minutos. El experimento culminó con una corta y rápida centrifugación (5 minutos a 2500 rpm). El sobrenadante obtenido fue monitoreado fotométricamente para determinar la hemólisis a 540 nm contra un blanco (Control de Fragilidad) que es preparado a partir de 50 μL de eritrocitos y 1950 μL de PBS (monitorización de la hemólisis espontánea) a los diferentes tiempos. El 100% de la hemólisis se consigue incubando los eritrocitos en agua destilada.

El porcentaje de hemólisis se determina por comparación de la absorbancia del sobrenadante con las muestras controles totalmente hemolizadas con agua destilada a 540 nm.

$$\% \text{Hemólisis} = \frac{A_i}{A_{100}} * 100$$

Donde

A_i : absorbancia correspondiente a cada concentración.

A_{100} : absorbancia correspondiente a la hemólisis total.

La concentración que produce un 50% de los eritrocitos hemolizados (CH_{50}), se determina por regresión lineal ^{(80), (81)}.

II)- Determinación de la Desnaturalización de la hemoglobina

Preparación de las muestras de ensayo.

Para determinar la desnaturalización de la hemoglobina el extracto de prueba se preparó a una concentración de 1mg/mL de manera similar a la descrita en el acápite 2.3.6. Se tomó una alícuota de 200 μ L de muestra, 50 μ L de suspensión eritrocítica ajustada a la concentración de oxihemoglobina ya descrita y 1750 μ L de PBS a pH 7.4. En este caso el blanco se realizó con 1800 μ L de PBS y 200 μ L de la sustancia a ensayar. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agitó vigorosamente y se centrifugó a 2500 rpm, durante 5 minutos. El sobrenadante se analizó a 540 y 575 nm en el espectrofotómetro. Se determinó el valor de R2 como el cociente de la absorbancia a 575 nm y a 540 nm, para ello se preparó una solución de Sodio-Deodecil-Sulfato (SDS) al 1% en PBS. Se tomó una alícuota de 200 μ L y se añadió 50 μ L de la suspensión eritrocítica y 1750 μ L de PBS (pH 7.4).

III)-Determinación del Índice de Desnaturalización (ID)

El índice de Desnaturalización (ID) se determinó calculando el cociente de la Absorbancia a 575 nm entre la Absorbancia a 540 nm lo que nos permite hallar el factor R2 (perteneciente al estándar interno SDS). El factor Ri es la relación de absorbancia obtenidas del producto a evaluar, y se determinó el cociente de Absorbancia a 575 nm entre Absorbancia a 540 nm. R1 es la relación que determinamos para oxihemoglobina humana y que tiene un valor de $1,05 \pm 0,001$. La diferencia (R1-R2) se define como el 100 % de desnaturalización de oxihemoglobina por efecto del SDS.

$$ID (\%) = \frac{100 (R1-Ri)}{(R1-R2)}$$

2.3.8 Interpretación de los resultados.

La inclinación positiva de la curva de hemólisis contra concentración, muestra el aumento en el daño celular, la liberación inmediata de oxihemoglobina se refleja en el aumento de absorbancia a mayor concentración del estándar. A partir de esta curva se determina la concentración hemolítica 50 (CH₅₀), responsable de la hemólisis del 50% de los eritrocitos. Se les realizó un tratamiento estadístico a los resultados obtenidos mediante un análisis de varianza simple con el software STAGRAPHIC versión 4.2. La clasificación final del extracto se realizó de acuerdo a los estándares establecidos por EVCAM para la prueba RBC (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de las sustancias que son evaluadas por la prueba RBC.

Cociente L/D <i>in vitro</i>	Estimación de la irritación ocular <i>in vivo</i>
> 100	No irritante
> 10	Ligeramente irritante
> 1	Moderadamente irritante
> 0,1	Irritante
< 0,1	Muy irritante

2.4 Experimento II. Evaluación de la toxicidad aguda oral por el Método de las Clases.

2.4.1 Justificación para la selección del sistema de estudio.

Atendiendo las recomendaciones del trabajo de investigación “Evaluación toxicológica de los sólidos pulverulentos del *Parthenium hysterophorus L.*” de Martínez, D del 2004 referido a la continuación de las evaluaciones toxicológicas por otras vías de administración, se realizó el estudio por el método de las clases, teniendo en cuenta que este es un ensayo de toxicidad alternativo reproducible, validado nacional e

internacionalmente y que cumple con todas las normativas del concepto de las tres "RRR"(Refinamiento, Reducción, Reemplazo), utilizando una cantidad menor de animales con respecto al ensayo clásico para determinar la toxicidad aguda de una sustancia.

Para este estudio ha sido demostrado tanto por las normas nacionales como internacionales que la especie seleccionada son las ratas, utilizando en este caso específico la línea Sprague Dawley dado el conocimiento previo de su comportamiento y sensibilidad.

2.4.2 Caracterización del sistema de estudio.

Especie: Rata.

Línea: Sprague Dawley

Número de animales: 18

Sexo: 9 Hembras-9Machos

Peso: 180 – 240 g

2.4.3 Variables a medir.

Informativas:

Registros promedios diarios de temperatura y humedad relativa en el local de alojamiento de los animales.

De respuesta:

Mortalidad.

Signos y síntomas clínicos de toxicidad.

Comportamiento de los pesos corporales.

Cambios anatomopatológicos macroscópicos y microscópicos.

2.4.4 Alojamiento y Cuarentena.

Al recibir los animales provenientes del Centro Nacional de producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), fueron inspeccionados para asegurar el estado de salud general

de la colonia, así como otros requisitos preestablecidos para aceptar a los mismos. Después de ser aceptados se alojaron en cajas T4 con fondo de rejilla, en grupos de tres animales del mismo sexo por caja. Su alimentación fue a base de dieta comercial certificada para roedores producidos en el CENPALAB y agua de la pila.

Los pomos, cajas y encamado se cambiaron dos veces por semana al igual que la limpieza del cubículo.

Los animales se mantuvieron en cuarentena por espacio de 5 días, inspeccionándose diariamente además se mantuvo durante todo el estudio a una temperatura de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de 30-70% a través de un deshumificador y sensores de temperatura, manteniendo además un ciclo de luz oscuridad 12/12 horas.

2.4.5 Sistema de Identificación.

Los animales que fueron usados en el estudio se identificaron individualmente mediante ponches en las orejas con un número específico para cada uno. Las cajas también se identificaron por medio de tarjetas en las cuáles se recogió la siguiente información: nombre del experimento, cantidad de animales por caja, sexo, número del animal, especie, línea y fecha de administración.

2.4.6 Preparación de la suspensión de los sólidos pulverulentos del *Parthenium hysterophorus*, L.

Se pesó 8.4 g de los sólidos pulverulentos y 2 g de carboxi-metil-celulosa (CMC), posteriormente se trasvasó la CMC a una capsula de porcelana y se le añadió 20 mL de agua destilada la cual se calentó y agitó hasta que se disolvió totalmente, después se trasvasaron los 8.4 g de los sólidos pulverulentos a un mortero y se le añadió lentamente con agitación la solución de CMC, seguidamente se trasvasó dicha mezcla a una copa graduada de 200 mL y se completo el volumen con agitación hasta enrasar usando agua destilada .

2.4.7 Tratamiento.

Fueron administradas dosis únicas de (50, 300 y 2000 mg/kg.p.v.) de la suspensión mencionada anteriormente por vía oral, preparándola a concentraciones que permitieran administrar estas dosis dentro de los volúmenes fisiológicos aceptables para la especie en estudio.

2.4.8 Diseño experimental.

Se retiró el alimento a los animales 18 horas antes de la aplicación. La muestra fue administrada por vía oral en dosis única mediante cánula intragástrica 18G, comenzando por la dosis de (50 mg/Kg.p.v), teniendo en cuenta los reportes descritos sobre la toxicidad de la planta. Posteriormente se ascendió al nivel de dosis próximo (300 mg/Kg.p.v) atendiendo a lo planteado por el método, que de no morir ningún animal en el nivel de dosis ensayado se escalará al nivel superior y finalmente se escaló al nivel de dosis superior (2000 mg/Kg.p.v). Se comenzó siempre por las hembras y posteriormente los machos.

Los animales fueron observados de manera sistemática durante los primeros 30 minutos y periódicamente durante las primeras 24 horas, con especial atención durante las 4 primeras horas y diariamente hasta los 14 días del experimento.

Las observaciones estuvieron dirigidas a la determinación de: muerte, tiempo de ocurrencia de la muerte, signos y síntomas de toxicidad, además de su comienzo y duraciones, incluyendo observaciones sobre cambios en la piel, membranas de mucosas y ojos, cambios en el sistema respiratorio, circulatorio, sistema nervioso central y autónomo, cambios en la actividad somatomotora y conducta, temblor, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, somnolencia y coma.

El peso corporal fue controlado los días 1, 7 y 14 del experimento. Se procedió al sacrificio de los animales el día 14 postadministración teniendo presente lo descrito por las metodologías de eutanasia⁽⁵⁸⁾.

2.4.9 Resultados.

Se determinó el rango de dosis en el cual se encuentra la LD₅₀ del producto en estudio en base a la mortalidad obtenida con las dosis ensayadas en cada sexo.

La clasificación final del producto se efectuó de acuerdo a los criterios establecidos por la OECD, vigentes también en nuestro país ⁽⁶³⁾.

CAPÍTULO III

Resultados y discusión.***3.1.1 Ensayos de solubilidad de los sólidos pulverulentos del *Parthenium hysterophorus*, L.***

Para la realización de los ensayos de solubilidad, los sólidos pulverulentos obtenidos de las partes aéreas de la planta (combinación de hojas y tallos), se sometieron a una extracción con etanol en máquina sacudidora, la elección del solvente se realizó atendiendo a las consideraciones teóricas reflejadas en la literatura sobre la relación estructura solubilidad de los sesquiterpenoides de interés. La partenina, lactona sesquiterpénica principal, es soluble de acuerdo a su naturaleza química en el solvente de extracción seleccionado.

Los resultados de los ensayos de solubilidad a los sólidos pulverulentos del *Parthenium hysterophorus*, L. son los siguientes: de acuerdo a la metodología de realización del ensayo descrita en el acápite 2.5.2, la variante evaluada es soluble en solución de DMS al 10 % y en solución de PBS a un pH 7.4.

3.1.2 Evaluación de la irritabilidad oftálmica del extracto obtenido a partir de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*, L. empleando el ensayo alternativo de hemólisis con células rojas humanas.

Una vez finalizado el ensayo se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 5). En los mismos se observó que al incrementar la concentración en los volúmenes preparados, aumentaba con ella el por ciento de hemólisis de manera significativa hasta alcanzar un 82 % de hemólisis, conjuntamente con este resultado al incrementar el tiempo de exposición también aumentó el por ciento de hemólisis, dejando esclarecido que dicho extracto presentó un % hemólisis que es dependiente de la concentración y el tiempo de exposición.

Como se obtuvo un por ciento de hemólisis superior al 50 en los diferentes tiempos evaluados se determinó la concentración hemolítica 50, el índice de desnaturalización y el cociente lisis desnaturalización para cada tiempo. (Tabla 6).

Tabla 5. Comportamiento del por ciento hemólisis de cada una de las concentraciones ensayadas a los diferentes tiempos de exposición:

Con (mg/mL)	% Hem 5 min	% Hem 30 min	% Hem 60 min
0.3833	3.03	4.5	5.8
0.5035	38.2	41	57.5
0.6505	47.5	54.7	64
0.7550	52	67	78.1
1.007	82	-	-

Leyenda:

Con: concentración (mg/mL)

% Hem 5 min: % de hemólisis a 5 minutos

% Hem 30 min: % de hemólisis a 30 minutos

% Hem 60 min: % de hemólisis a 60 minutos

Tabla 6. Valores de la concentración hemolítica 50, índice de desnaturalización y el cociente de lisis desnaturalización a diferentes tiempos de lectura.

Tiempo (minutos)	CH-50 (mg/mL)	ID	L/D
t-5 min	0.7079	273.7	0.0026
t-30 min	0.6246	276.4	0.0023
t-60 min	0.0565	281.7	0.0002

Leyenda:

CH-50: concentración hemolítica 50

ID: índice de desnaturalización

L/D: lisis desnaturalización

t-5 min: tiempo a 5 minutos

t-30 min: tiempo a 30 minutos

t-60 min: tiempo a 60 minutos

Se les realizó un análisis de varianza simple empleando la suma de los cuadrados a los resultados, con el objetivo de demostrar la posible existencia de diferencias significativas entre las variables concentración, tiempo y por ciento de hemólisis (anexo1); para ello fue utilizado el programa estadístico STAGRAPHIC para Windows versión 4.2 del 2004, el cual demostró la existencia de diferencias significativas entre las mismas, ratificando la influencia de la concentración y el tiempo de lectura del extracto de prueba sobre la hemólisis de los eritrocitos humanos.

De acuerdo a los resultados obtenidos el extracto es clasificado como muy irritante ocular según los criterios de clasificación validados por la ECVAM.

Atendiendo a los resultados obtenidos para este ensayo, se puede concluir que la aplicación directa del extracto a una concentración de 1mg/mL en los eritrocitos a los 5 minutos, provocó un por ciento de hemólisis superior al 50, no obstante el resto de las diluciones preparadas a los diferentes tiempos de exposición muestran un incremento en la actividad irritante en las estructuras oculares.

El incremento gradual del por ciento de hemólisis al transcurrir los diferentes tiempos de lecturas evaluados, coincide con los resultados descritos en estudios anteriores realizados a la planta (28), (89) los cuales señalaban que durante las primeras horas de administración de la sustancia en estudio, provocaba alteraciones en el tejido ocular que con el transcurso del tiempo disminuían paulatinamente. Seguidamente la determinación del segundo punto final de este ensayo, que es el índice de desnaturalización, conjuntamente con el cociente lisis/ índice de desnaturalización, muestran un valor, el cual permitió clasificar el extracto como muy irritante para las estructuras oculares. También el resultado del procesamiento estadístico confirma que el por ciento de hemólisis es dependiente de variables como la concentración y el tiempo de lectura del extracto en estudio.

Esta clasificación propicia divergencia con los resultados ya citados anteriormente, los cuales clasificaban a la planta como no irritante ocular (28), (89), aunque no

dejaban de señalar la posible sobrestimación del daño que pudiera causar el *Parthenium hysterophorus*, L en humanos, puesto que dichos estudios se realizaron en conejos. Además el test desarrollado en este trabajo investigativo fue in vitro, el cual no incluye los posibles mecanismos fisiológicos y mecánicos que poseen las estructuras oculares para disminuir los daños a este nivel de órgano como el lagrimeo, el parpadeo, la formación de legañas etc. Por lo que el resultado obtenido en este ensayo nos hace una alerta sobre lo que pudiera suceder ante una posible exposición a la planta; por lo que se recomienda continuar futuros estudios sobre irritabilidad ocular que complementen la información del extracto vegetal sobre este órgano.

3.1.3 Evaluación de la toxicidad aguda oral por el Método de las Clases.

Una vez concluido el ensayo, se obtuvo como resultado un 100 % de supervivencia en todos los animales involucrados en el estudio (Tabla 7). Tras la administración oral de la suspensión de los sólidos pulverulentos del *Parthenium hysterophorus*, L; a los diferentes niveles de dosis (50 mg/Kg., 300 mg/Kg., 2000 mg/Kg.). No se observó signos ni síntomas tóxicos en los animales de experimentación.

Los pesos corporales se controlaron según lo establecido en la metodología aplicada, su comportamiento se muestra en la (Tabla 8), además conjuntamente con estos, se calculó la media y desviación estándar de los mismos en ambos sexos, observándose un incremento de estas variables durante el transcurso del ensayo coincidiendo con los valores estipulados para la línea y especie en estudio.

Tabla 7. Comportamiento de la mortalidad después de la administración oral a dosis única de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*, L. en ratas Sprague Dawley.

Producto ensayado	# de animales	Sexo	Nivel dosis (mg/K g.p.v)	# de muertes
Suspensión de <i>Parthenium hysterophorus</i>	3	H	50	0
	3	M	50	0
	3	H	300	0
	3	M	300	0
	3	H	2000	0
	3	M	2000	0

Tabla 8. Comportamiento de los pesos corporales durante el 1^{er}, 7^{mo}, 14^{to} día después de la administración oral a dosis única de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*, L. en ratas Spraguey Dawley.

Sexo	No. de animales	Nivel de Dosis (mg/Kg.p.v)	Peso inicial Media ± SD	Peso 7 días Media ± SD	Peso 14 días Media ± SD
M	3	50	214±2.89	234±1,57	244±1,65
F	3	50	195,3 ± 0,58	209 ±3,53	220 ±2,52
M	3	300	224,3 ±4,01	241 ±7,62	248 ±4,39
F	3	300	200 ±0,53	208 ±1,56	219 ±1,08
M	3	2000	213±5,57	221±6,34	233±4,39
F	3	2000	189±0,65	206±3,65	218±2,82

Para concluir fueron eutanaciados todos los animales, con el objetivo de someter los órganos a un examen anatomopatológico a partir de criterios macroscópicos, en el cual no se evidenciaron daños groseros en sus estructuras.

Los resultados obtenidos tras ser administrada la suspensión con los sólidos pulverulentos del *Parthenium* a los diferentes niveles de dosis ensayados (50 mg/Kg, 300mg/Kg, 2000mg/Kg.), mostraron la ausencia de muerte en los animales de estudio.

De igual forma no se observaron signos ni síntomas clínicos tóxicos y todos los animales mostraron un comportamiento normal durante el transcurso del experimento.

Los reportes de toxicidad descritos sobre la planta comentan que solo se han encontrado muerte en animales tras ingestiones sucesivas del *Parthenium hysterophorus* o administraciones de la partenina aislada por esta vía de administración, lo cual sugiere la realización de estudios a dosis repetidas que permitan realizar un análisis integral de la toxicidad del polvo de la planta. (32), (33), (41), (42)

Otro indicador que avala la ausencia de toxicidad es el incremento progresivo del peso corporal en los animales tanto de hembras como en machos, corroborando la no existencia de daño sistémico relacionado con la administración de la planta además de no existir diferencias de susceptibilidad entre ambos sexos tras ser expuestos a el *Parthenium hysterophorus L.*

Por último se realizó un examen macroscópico a los órganos y tejidos de los animales ya eutanaciados. Siendo esta una de las evaluaciones más importantes y concluyentes al finalizar un estudio toxicológico, donde no se observaron daños en ninguno de los órganos y tejidos analizados.

Atendiendo a todo lo mencionado anteriormente se concluye en esta investigación que la dosis letal 50 (DL 50) del *Parthenium hysterophorus L.* es superior a 2000 mg/Kg de peso, por lo que se considera como NO CLASIFICADO (no tóxico) según la metodología de ensayo y sistema de clasificación empleado, aceptado tanto nacional como internacionalmente para este fin.

CONCLUSIONES

Conclusiones.

1. La aplicación oral de los sólidos pulverulentos del *Parthenium hysterophorus*, L a dosis única, demostró que la DL 50 de la muestra de ensayo es superior a 2000 mg/Kg.p.v, por lo que es clasificada como (no tóxica).
2. El extracto vegetal (combinación de hojas y tallos) se clasifica como muy irritante a nivel ocular de acuerdo al ensayo alternativo empleando eritrocitos humanos, como modelo experimental.

Recomendaciones

Recomendaciones.

1. Realizar estudios de toxicidad oral a dosis repetida a los sólidos pulverulentos del *Parthenium hysterophorus*, L
2. Desarrollar otras técnicas alternativas de irritabilidad oftálmica que permitan evaluar el grado de irritabilidad ocular del material vegetal.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía.

1. Shelke, D.K, Srivastava, J.N. Parthenium and its control areview. Pestsides; 1984; 18:51-54.
2. Pankaj, O. Society for Parthenium Mangement (SOPAM) 28-A, Geeta Nagar Raipur 49, 2001, India. Disponible en; [www. Celestine-india.com/pankajoudhia](http://www.Celestine-india.com/pankajoudhia).
3. Mahadeveppa, M. Ecology, distribution, menace and management of *Parthenium*".In: Proc First International Conference on *Parthenium* Management. UAS, and Dharwad 1997; 1: p.1-12.
4. Jovanovich, M y Poljacki, M. ``Compositae dermatitis''. Med Pregl.2003 Jan-Feb; 37:182-184
5. Kologi, D. Kologi, S. Kologi, NP. Dermatologic hazards of Parthenium in human beings.1988; 4 en línea [http//www.iprng.org/IPRNG-parthenium a &w21.htm](http://www.iprng.org/IPRNG-parthenium_a&w21.htm).
6. Sriramarao, P. Nagpal, S. Rao, B. S. Prakash, O., and Rao, P. V. Immediate hypersensitivity to *Parthenium hysterophorus*.1993; 2 en linea [http//www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/natural/patient-feverfew.html](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/natural/patient-feverfew.html)
7. Roig y Mesa. Plantas medicinales aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana: Editorial de Ciencia y Técnica, 1972, p352.
8. The Journal of the American Botanical Council. Santa Maria Feverfew: not the feverfew of comers. Herbal Gram.1991;25:40
9. Roig, J. T : Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos.La Habana: Editorial Nacional de Cuba,1975,
10. *Parthenium hysterophorus* L. Plantas Medicinales. Fitomed II. La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
11. Roig y Mesa. Plantas medicinales aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana: Editorial de Ciencia y Técnica, 1972, p356.
12. Houn, P. R., Lagos S. Ochra, C. Torres, T. Mejias. M. Plantas medicinales comunes en Honduras .1ra edición, enero 1995.

13. Seit, V.K, Kould, S.K; Taneja, S.C y Dhar, L.: Minor sesquiterpene of flowers of *Parthenium Hysterophorus* L. *Ftochemistry*. 1978, vol.26(12): 3359-3361,
14. Guin, J .D. Sidmore, G. *Compositatae dermatitis in childhood*. *Arch Dermatol*.1987; 123(4):500.
15. Guías metodológicas para la investigación en Plantas Medicinales. Dirección de Ciencia y Tecnología. MINSAP, 1997.
16. Cho, J. Y, Kim, A.R, Joo, H.G, Kim, B.H, Rhee, M.H, Yoo, E.S. Cynaroicrin, a sesquiterpene lactone as a new strong regulador of CD29 and CD98 fuctions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 313(4):954-961.
17. Meww, D., F.Balza, G.H.N.Towers, I.G.Antitumour effects of the sesquiterpene lactone parthenin.*Planta Medica* .1982.45:23-27
18. Nogueiras.C.Trabajo de Diploma Identificación y caracterización de la partenina, principal lactona sesquiterpénicas del *Parthenium Hysterophorus* L., 1993
19. Stuttgart, B. Chatterjee, M. Antitumor activity of *Parthenium hysterophorus* L. and its effect in the modulation of biotransforming enzymes in transplanted murine leukaemia. *Plant Med*.Dec 1993; 59 (6): (513-516).
20. Talakal, T.S, Dwivedi, S.K, Sharma, S.R. In vitro and in vivo therapeutic activity of *Parthenium Hysterophorus* against *Trypanosoma evansi*.*Indian-3-Exp-Biol*.1995 Nov; 33(11):894-896.
21. Aguila, B. Meneses, R. Extracto acuoso de escoba amarga.Estudio preliminar de sus propiedad .*Rev Cubana Plant Med* .5 (3) Ciudad de la Habana sep.-dic. 2000
22. Larrondo, R.J, Larrondo, R.P. Gonzáles, R. Hernandez, L.M Consideraciones sobre el control de la escabiosis en la atención primaria.
23. Lonkar, A. Nagasampagi, B.A.Narayan,C.R. Landge,A.B. Sawaikar,D.D.An antigen from *Parthenium hysterophorus* L. *Contac- Dermatitis*, 1976 Jun;2(3):151-154

24. Rodríguez, E. Dillon, M. O. Mabry, T. J. Mitchell, J. C. Towers, G. H. Dermatology active sesquiterpene lactones in trichomes of *Parthenium hysterophorus* L. *Experientia*. 1976, Feb 15; 32(2): 236-238
25. Bocca, C. L. Bozzo, F. Mglieta, A. A. Sesquiterpene lactone, costunolide, interacts with microtubule protein and inhibits the growth of MCF-7 cell. *Chem Biol Interact* 2004; 147(1): 79-86
26. Pickman, A. K. Rodríguez, G. Towers, G. H. N. Formation of adducts of parthenin and related sesquiterpene lactones with cysteine and glutathione. *Chem Biol Interact*. 1979; 28(1): 83-89
27. Martínez, S. D. Trabajo de Diploma Estudios Toxicológicos de los sólidos pulverulentos obtenidos del *Parthenium hysterophorus* L. (escoba amarga) , 2004
28. Gupta, N. Martin, B. Metcalfe, D. Identification of a novel hydroxyproline rich glycoprotein as the major allergen in *Parthenium* pollen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1996; 88: 903-912.
29. Sethi, V. K; Kould, S. K: Minor sesquiterpene of flowers of *Parthenium hysterophorus* L. *Fitochemistry*. 1978; 26(12): 3359-3361
30. Sharma, S. C. Kaur, S. Airborne contact dermatitis from Compositae plants in northern India. *Contact-Dermatitis*. 1989 Jul; 21(1): 1-5.
31. Narasimhan, B. Harindranath, N. Characterization of a toxin from *Parthenium hysterophorus* and its mode of excretion in animals. December 1984; 6(5): 729-738.
32. Prakash, N. Reddy, T. Ramachandra, B. Experimental *Parthenium* toxicosis in rabbits: observations on short term exposure to methanolic extract of *Parthenium hysterophorus* . *India J Toxicol*, 9(1), 2002, 17-21 disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
33. Ahmed, M. N. Rao, P. R. Mahendar, M. Hematological observations in experimental Partheniosis in buffalo calves. *Indian Vet J* 1998; 65 (11): 972-974.

34. Nandakishore, J. Pasricha, J.S. Pattern of cross-sensitivity between 4 Compositae plants, Parthenium, Xanthium, Helianthus, Chrysanthemum in India patients. Contact-Dermatitis.1994 Mar; 30 (3):162-167
35. Kologi, D.Kologi, S.D.Dermatologic hazards of Parthenium in human beings en línea: [http://www.iprng.org/IPRNG-parthenium a&w 21.htm](http://www.iprng.org/IPRNG-parthenium%20a&w%2021.htm)
36. McFadeyn, R.E.Health Abstracts. Parthenium weed & human health in Queensland. Australian Family Physician 24:1455-58, 1995. Disponible en [http://www.cbit.uq.edu.au/biocontrol/pest plant management/ Parthenium abstracts.htm](http://www.cbit.uq.edu.au/biocontrol/pest%20plant%20management/Parthenium%20abstracts.htm).
37. Moller, H.Spiren, A. Contact allergy to the Asteraceae plant Ambrosia artemisifolia L.(ragweed) in sesquiterpene lactone-sensitive patients in southern Sweden.Contact-Dermatitis.2002 Sep; 47(3) :157-160. disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
38. Wedner, H.J.Zenger, V.E.Lewis, W.H.Allergy reactivity of Parthenium hysterophorus (Santa Maria feverfew) pollen; an unrecognized allergen .Int-Arch Allergy- Immunol.1987, 84(2):115-122.
39. Sriramarao, P. Gupta, N .Immunochemical characterization of rapid and slowly released allergenic from the pollen of Parthenium hysterophorus .Int- Arch Allergy-Immunol.1995, 107(4):557-565.
40. Tanner, A.S.Mattocks, A.R. Hypothesis: plant and fungal biocides, copper and Indian childhood liver disease. Ann-Trop-Paediart.1987 Dec; 7(4):264-269.
41. Narasimhan, T.R. Ananth, M.Toxity of Parthenium hysterophorus L. to cattle and buffaloes. Experientia,1977 Oct 15; 33(10): 1358-59
42. Adverse Reactions to Complementary Alternative Medicines(including Echinacea)Disponible <http://www.allergycapital.com.au/Pages/CAM.html>
43. Dr. Guardarrama, Suárez. I, Hernandez, Parits. M. Introducción a la fitoterapia y la medicina tradicional.
44. Ramos, A.Rivero, and R.Assesment of mutagenicity in Parthenium hysterophorus L. J Ethno pharmacol.2001 Sep; 77(1): 9-13.

45. Narasinhani, T.R y Haridrananth, N. Efecto de la partenina en la fosforilación oxidativa mitocondrial. *Biochem. Int.* Aug 1985;11(2): 239-244.
46. Picman, J. Picman, A.K. Treatment of dermatitis from parthenin. *Contact-Dermatitis*. 1985 Jul; 13(1): 9-13.
47. Chu, I.H. Toft, P. Recent progress in the eye irritation Test. *Toxicol IND Health* disponible en <http://www.envisitrc.com>.
48. Dr. Mahadevappa, M. Parthenium dreaded weed. En línea .New Delhi. http://www.iprnc.org/a_dreaded_weed. 7 de Dic ,2003
49. Chapman & Hall. P.F from DNP on CD-ROM, Version 14, 1.1
50. Nociones básicas de toxicología. disponible en [http:// www.disaster-info.net/quimicos/index_folder/word_html/4/4.html](http://www.disaster-info.net/quimicos/index_folder/word_html/4/4.html)
51. Dr. Vega, P. Toxicología de los alimentos .Instituto Nacional de de Salud Publica Centro Nacional de Salud ambiental .México Leticia D.F. 2000
52. Casarez, E. Basic Principles of Toxicology. *BIOC*, 579c. Jan, 10, 2001
53. WEB Site de la FDA: <http://www.fda.gov/cder/guidance.htm>
54. WEB Site de la EMEA: <http://www.eudra.org/humandocs/humans/ich.htm>
55. Donald, J. Ecobichon, E. The Basis of Toxicity Testing. 2ª Edición- CRC Pres., 1997 ISBN 0-8493-8554-7
56. Zbiden, G. Fluir, M. Significance of the LD50 test for the toxicological evaluation of chemical substance. *Arch Toxicol*. 1989, 47:77-99.
57. Denier, W. Siccha, L. The biometric evaluation of the acute toxic class method (oral). *Arch Toxicol* 1994; 68:599-610.
58. Hartung, T. Bremer, S. Castaic, S. ECVAM's Response to the Changing Political Environment for Alternatives: Consequences of the European Union Chemicals and Cosmetics Policies. *Arch , ATLA* 31, 473-481, 2003
59. Repetto, G. Instituto Nacional de Toxicología, BOLETIN GTEMA N° 21, Año 2001 Email: repetto@sev.inaltox.es.
60. METODOS ALTERNATIVOS: CONCEPTOS BASICOS. Disponible en <http://tox.umh.es/aetox/Grupos/gtema/>

61. Balls, M., Goldberg, A., Fenten, J. The report and recommendation of ECVAM workshop. The three R. The way forward. Arch, ATLA, 23,383-398; 1995.
62. AET Granada99. SESIÓN MÉTODOS ALTERNATIVOS disponible en tox.umh.es/aetox/revista/Granada99/granada99_09.html
63. OECD. Guidelines for testing of chemical. Acute oral toxicity, No.401. Revised Draft Guideline, October 2000, disponible en <http://www.oecd.org>.
64. OECD. Guidelines for testing of chemical. Acute oral toxicity. Acute Toxic Class Method. No.423. Revised Draft Guideline, October 2000, Disponible en <http://www.oecd.org>.
65. Walum, E. Acute Oral Toxicity. Environmental Health Perspectives .April 1998; 106 Supplement 2
66. Schlede, E. Mischke, U., Diener, W., Kayser, D. The international validation studies of the acute toxic class method (oral). Arch Toxicol. 1995; 69(10):659-670. PMID: 8572922 [Pub Med - indexed for MEDLINE]
67. Sharmag, I., Bhutain, K.K. Plant based anti-amoebic drugs; part II. Amoebicidal activity of Parthenium isolated from Parthenium hysterophorus .Planta medica Jan 30, 1987.
68. Balls M, N Berg N, Bruner L., Eye Irritation Testing: The Way Forward The Report and Recommendations of ECVAM Workshop .Arch, ATLA 27, 53-77, 1999
69. Murillo G, Pérez Marqués U, Tur, E. Estudio comparativo de tres variantes del ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de la gallina para la evaluación de la irritación ocular. Rev. Toxicol. (2003) 20: 187-192
70. Matsuno, H .Basic studies for establishment of alternatives to in vivo ocular toxicity test. Toxicity of local anesthetics by opacitometer method .Oudagaku Shigakushi, 1992; 19(1):28-46.
71. Wilhelmus, K. R. The Draize eye test. Disponible en <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?/temp/~NiLG8r:8>

72. Katsuta ,Y. Study on the alternative method to Draize test. Ocular irritancy toxicity of chlorophenols by opacitometer meth. Ou Daigaku Shigakushi 1992; 19(1):47-73.
73. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of chemicals (ECETOC).Eye irritation.Brussels;1999
74. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of chemicals (ECETOC).Good Laboratory Practice.Brussels;1999
75. Kruszewski, F.H.Human cell as in vitro alternatives for ocular and dermal toxicity studies. Comm.Toxicol,6:221-223
76. Cottin, M.De Silva O. Catroux P. The use of in vitro methods in the ocular irritation assessment. Toxicol in Vitro 1994; 8(4):893-905. Disponible en <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?/temp/~M0feAC:14>
77. Kain, D.J. Roberts, D.A. Parker, R.D. Evaluation of seven in vitro alternatives for ocular safety the. Fund Appl Toxicol 1991; 17(1):136-149.
78. Vanparys, P.Deknudt ,G.Teuns, G. Evaluation of the bovine corneal opacity-permeability assay as an in vitro alternative to the Draize eye irritation test. : Toxicol in Vitro 1993; 7(4):471-486.
79. Dr. Lewis, R.W. Park, A.Protocolo 37. Red Blood Cell Lyses and Protein Denaturation. del In Vitro Toxicity INVITOX, *June, 1994*
80. Murillo, J. Ulpiano, Pérez, L. Naranjo, E. Incorporación de dos ensayos alternativos para evaluar irritación ocular en un laboratorio de toxicología. Rev. Cubana Farm 2004;38(3)
81. Pacheco, M.Orellanes, I.García, G. Ensayo Alternativo de Irritabilidad Ocular a través del Método de las Células Rojas Sanguíneas (RBC) en diferentes productos,2003.
82. Parada, J. Arbesún, G .Pérez, O. Toxicidad Oral Aguda de un Fertilizante Foliar (Sharp Oral toxicity of. Fertilizer to Foliate). Revista Electrónica de Veterinaria REDVET ®, ISSN 1695-7504, Vol. VII, nº 04, Abril/2006.Disponible

83. Seibert, H. Ball, M. Actue Toxicity Tensing In Vitro and the Classification and labeling of Chemicals. The Report AND Recommendation of ECVAM Workshop. *Atla* 24, 499-510.1996
84. Schlede, E. Genschow, E. Spielmann, H. Oral acute class method: a successful to the oral LD50 test. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2005 Jun; 42(1):15-23. Epub 2005 Apr 8.
85. Skowron, J. Zapor, L. Miranowicz, Dzierzawska K. Classification of the substances on the Basis of the Actue-Toxic-Clas Method. *Int J Occup Saf Ergon.* 1998;4(1):107-116.
86. Stokes, W.S. Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing. *ILAR J.* 2002; 43 Suppl: S31-8.
87. Vega Montalvo, R. Álvarez, Fong, M. Irritación ocular: Modelos alternativos. *Rev. Cubana Farm* 2001; 35(3):211-18. Versión impresa por ISSN 0034-7515
88. Águila, Gil, B. Fernández, Fernández, D. Quirós, Luis .Y. Estudio de irritabilidad dérmica y oftálmica de una formulación de Escoba Amarga (*Parthenium hysterophorus* Lin.). Taller de Productos Naturales ,Plantas Medicinales, Medicinal Tradicional.2006, disponible en
89. Norma Ramal de Salud Publica # 309 .1992

ANEXOS

Anexo # 1. Analisis de varianza simple, empleando la suma de los cuadrados

Analysis of Variance for PorcM - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Conc	6541.57	3	2180.52	35.86	0.0003
B:Time	921.893	2	460.946	7.58	0.0228
RESIDUAL	364.808	6	60.8014		
TOTAL (CORRECTED)	7828.27	11			

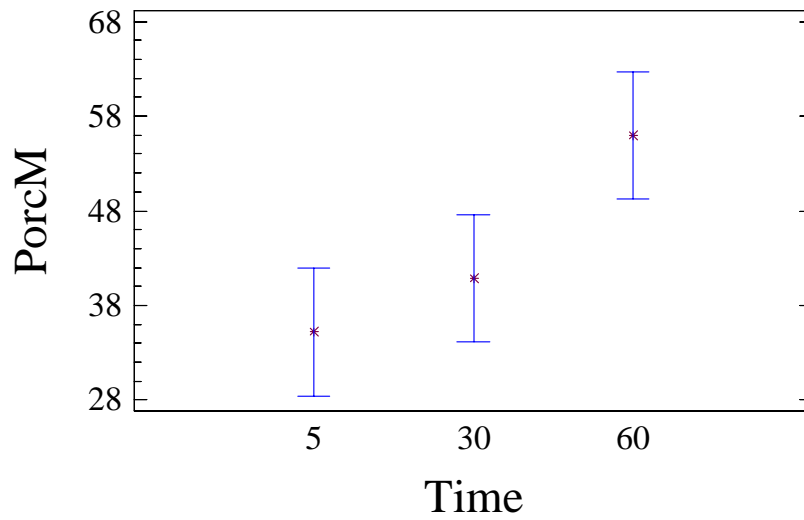
All F-ratios are based on the residual mean square error.

Anexo # 2. Tablas que representa la media de la suma de los cuadrados con un 95 % de intervalo de confianza

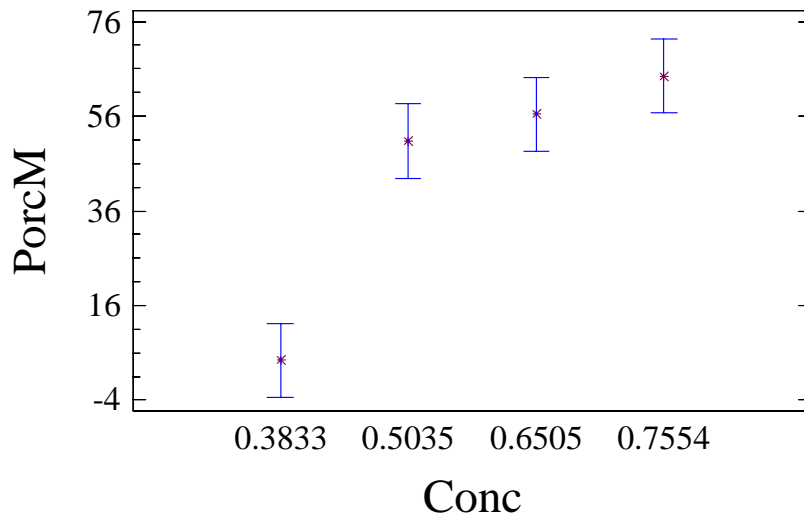
Table of Least Squares Means for PorcM with 95.0 Percent Confidence Intervals

Level	Count	Mean	Std. Error	Lower Limit	Upper Limit
GRAND MEAN	12	43.9942			
Conc					
0.3833	3	4.44333	4.5019	-6.57246	15.4591
0.5035	3	50.7333	4.5019	39.7175	61.7491
0.6505	3	56.3667	4.5019	45.3509	67.3825
0.7554	3	64.4333	4.5019	53.4175	75.4491
Time					
5	4	35.1825	3.89876	25.6425	44.7225
30	4	40.85	3.89876	31.31	50.39
60	4	55.95	3.89876	46.41	65.49

Means and 95.0 Percent LSD Intervals



Means and 95.0 Percent LSD Intervals



Residual Plot for PorcM

