



The Biologist (Lima)



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

ACUTE TOXICITY OF THREE MOUTHWASHES BASED ON *PLANTAGO MAJOR*, *UNCARIA TOMENTOSA* AND *EUCALYPTUS GLOBULUS* ON BRINE SHRIMP *ARTEMIA FRANCISCANA*

TOXICIDAD AGUDA DE TRES ENJUAGUES BUCALES A BASE DE *PLANTAGO MAJOR*, *UNCARIA TOMENTOSA* Y *EUCALYPTUS GLOBULUS* EN EL CAMARÓN SALINO *ARTEMIA FRANCISCANA*

Leslie E. Lozano-Mercado^{1,2}; Carmen Rosa García-Ruapaya¹; Lorena Alvariano² & José Iannacone^{2,3}

¹ Facultad de Odontología. Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima, Perú.
leslie11_evelyn89@hotmail.com

² Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática.
Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima, Perú.

³ Laboratorio de Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú.
Autor para correspondencia: joseiannacone@gmail.com

ABSTRACT

Natural plants have long been researched to check their healing properties. Peru thanks to its biodiversity has many plants that have been evaluated with properties that may improve oral health, but to be used by people it is necessary first to verify lack of toxicity. The objective of this investigation was to evaluate the acute toxicity of three oral rinses based on *Plantago major* L. "broadleaf plantain", *Uncaria tomentosa* (Willd. Ex Schult.) DC. "Cat's claw" and *Eucalyptus globulus* Labill. "Eucalyptus" on *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 "brine shrimp". The toxicity test consisted of exposing *A. franciscana* II instar nauplii to alcoholic and aqueous mouthwashes at 24 h and 48 h of exposure. The mean Lethal Concentration (LC₅₀) for each mouthwash was determined and its toxicity level was classified according to Meyer and Clarkson toxicity indices. Mouthwashes based on *P. major*, *U. tomentosa* and *E. globulus* have low toxicity indices on the Clarkson scale. Alcoholic rinses (751.74 - 881.68) based on LC₅₀ (ug·mL⁻¹) were as toxic in *A. franciscana* as non-alcoholic rinses (470.68 - 894.87). The most toxic alcoholic mouthwash was *U. tomentosa*, and the most toxic aqueous mouthwash was *E. globulus*. At the end of the experiment, toxicity in *A. franciscana* was found to be low, based on Meyer and Clarkson toxicity indices, showing that all three mouthwashes could be used with caution.

Key words: *Artemia franciscana* – brine shrimp – *Eucalyptus globulus* – mouthwashes – *Plantago major* – *Uncaria tomentosa*

RESUMEN

Las plantas naturales han sido durante mucho tiempo investigadas para comprobar sus propiedades curativas. El Perú gracias a su biodiversidad posee muchas plantas que han sido evaluadas con propiedades que colaboran con la salud bucal, pero para ser prescritas a los pacientes es necesario comprobar que su toxicidad. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la toxicidad aguda de tres enjuagues bucales a base de *Plantago major* L. “Llantén”, *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC. “Uña de gato” y *Eucalyptus globulus* Labill. “Eucalipto” sobre *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 “Camarón salino”. El ensayo de toxicidad consistió en exponer a nauplios de II instar de *A. franciscana* a enjuagues bucales alcohólicos y acuosos a 24 h y 48 h de exposición. Se determinó la Concentración letal media (CL₅₀) para cada enjuague bucal y se clasificó su nivel de toxicidad según los índices de toxicidad de Meyer y de Clarkson. Los enjuagues bucales a base de *P. major*, *U. tomentosa* y *E. globulus* son poco tóxicos según la escala de Clarkson. Los enjuagues alcohólicos (751,74-881,68) en base a la CL₅₀ (ug·mL⁻¹) resultaron igual de tóxicos en *A. franciscana* que los enjuagues sin alcohol (470,68- 894,87). El enjuague bucal alcohólico más tóxico fue el de *U. tomentosa*, y el enjuague bucal acuoso más tóxico fue el de *E. globulus*. Al finalizar se encontró poca toxicidad en estas plantas sobre *A. franciscana*, en base a los índices de toxicidad de Meyer y de Clarkson, lo que demuestra que se podrían usar los tres enjuagues bucales con cautela.

Palabras clave: *Artemia franciscana* – camarón salino – enjuague bucal – *Eucalyptus globulus* – *Plantago major* – *Uncaria tomentosa*

INTRODUCCIÓN

A través de la historia se registra el uso de diferentes plantas para tratar males y afecciones, y muchas poblaciones se han salvado de enfermedades con ellas (Hamidi *et al.*, 2014; Ayala *et al.*, 2017). En el Perú, existen diversas plantas que son usadas con fines terapéuticos, la manera de uso y sus propiedades se han conocido por generaciones, como es el caso del *Plantago major* L. “Llantén”, *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC. “Uña de gato” y *Eucalyptus globulus* Labill. “Eucalipto” que son abundantes y de fácil adquisición en el Perú (Cabieses, 1993; Brack, 1999; Ayala *et al.*, 2017).

Los beneficios difundidos de las plantas han conducido a realizar investigaciones para comprobar científicamente sus propiedades; es así que en el caso de las plantas antes mencionadas se tiene conocimiento de sus acciones antiinflamatorias, antibióticas, cicatrizantes, entre otras (Cabieses, 1993; Krenmayr *et al.*, 2000; Desmarchelier & Schaus, 2000). Dentro de la odontología, estas plantas presentan propiedades que pueden utilizarse para combatir enfermedades como la gingivitis. Los enjuagues bucales a base de plantas medicinales con estudios que comprueben

su éxito, podrían reemplazar a los enjuagues existentes en el mercado que presentan efectos adversos. El siguiente paso es analizar el efecto de estos enjuagues bucales a base de plantas en los individuos clínicos. Por ello es de suma importancia determinar si tienen efecto tóxico en los seres que las consuman, y de ser así que nivel de toxicidad presenta antes de ser probada en pacientes (Schmalz, 1994; Pelka *et al.*, 2000; Calixto-Cotos, 2006).

La toxicología es la ciencia encargada de estudiar el efecto tóxico de diferentes sustancias, para ello son usadas diferentes pruebas ya sea *in vitro* o *in vivo*, aunque el elevado costo de algunas pruebas y el sacrificio de animales vertebrados ha llevado a la búsqueda de otras alternativas que disminuyan el presupuesto requerido y el estrés en estos animales mayores (Schmalz, 1994; Dumitrascu, 2011; Hamidi *et al.*, 2014; Sobrino-Figueroa, 2015; Ayala *et al.*, 2017).

Se ha investigado la toxicidad de los extractos acuosos de *U. tomentosa* en las células ováricas de hamsters chinos (Santa-María *et al.*, 1997) y la toxicidad aguda de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *P. major* en ratones (Lagarto-Parra *et al.*, 1999; García *et al.*, 2003).

Se ha evaluado la toxicidad de diversas sustancias químicas orgánico-sintéticas y de extractos de plantas frente a nauplios de *Artemia* para determinar la concentración letal media (CL₅₀) (Meyer *et al.*, 1982; Lagarto-Parra *et al.*, 2001; Krishnaraju *et al.*, 2005; Dvorak *et al.*, 2012; Gadir, 2012; Hamadi *et al.*, 2014; Iannacone *et al.*, 2016). Estos valores obtenidos nos muestran actividades fisiológicas o biológicas, pero no son concluyentes, es decir que son necesarios más estudios para encontrar las causales de toxicidad, pero sí proporcionan un nivel de toxicidad necesario para manejar rangos de aplicación de las sustancias evaluadas (Meyer *et al.*, 1982; Salgado, 2001).

Dentro de estos ensayos, tenemos a *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 “Camarón salino” que lleva ya varios años de empleo, siendo empleado con éxito para pruebas de toxicidad letal aguda, y que presenta resultados muy similares a los realizados sobre roedores u otros animales (Dvorak *et al.*, 2012); además de ser una prueba que no requiere un alto presupuesto, y no produce estrés, ni sacrificio de animales vertebrados (Sorgeloos, 1978; Krishnaraju *et al.*, 2005; Pino & Jorge, 2010; Hamidi *et al.*, 2014; Rajabi *et al.*, 2015; Sarah *et al.*, 2017).

El uso del ensayo con el “Camarón salino” se ha extendido a las ciencias naturales, a las ingenierías y otras ramas de la ciencia. Dentro del campo de la odontología no registra antecedentes, pero es un ensayo de fácil realización, de bajo costo, de fácil manipulación de los sujetos experimentales y que no requiere someter animales vertebrados a gran estrés, es por ello que aún se usa en investigaciones biomédicas y ambientales (Krishnaraju *et al.*, 2005; Dumitrascu, 2011; Rajabi *et al.*, 2015; Iannacone *et al.*, 2016; Sarah *et al.*, 2017).

La especie *A. franciscana*, no es propia del Perú, pero es muy utilizada en acuicultura y ecotoxicología (Carballo *et al.*, 2002; Baniaman, 2014), debido a la fácil importación y adquisición de los huevos de esta especie, que tienen altas tasas de eclosión y que son de fácil manipulación (Krishnaraju *et al.*, 2005; Gadir, 2012; Hamidi *et al.*, 2014; Iannacone *et al.*, 2016; Sarah *et al.*, 2017).

Se ha evaluado con el “Camarón salino”, el efecto

de diferentes compuestos químicos como aceites esenciales de especies vegetales – aromáticas (Flores *et al.*, 1999; Ramachandram *et al.*, 2011; Gadir, 2012) e inclusive resinas dentales (Pelka *et al.*, 2000; Milhem *et al.*, 2008; Iannacone *et al.*, 2016).

En el siguiente estudio se busca evaluar la toxicidad aguda de tres enjuagues bucales a base de *P. major*, *U. tomentosa* y *E. globulus* sobre *A. franciscana* “Camarón salino”.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación fue de tipo experimental, prospectiva, transversal y comparativa.

Enjuagues bucales a base de plantas medicinales

Obtención de las plantas

Las hojas de las tres plantas: *P. major*, *U. tomentosa* y *E. globulus* se seleccionaron en base a la información encontrada en la literatura respecto a la forma de utilización de la especie por la población (Ayala *et al.*, 2017). Las plantas se colectaron con cuidado para evitar la contaminación con materiales extraños. En el caso de las hojas de *P. major* y de *E. globulus* se colectaron en el distrito de Carabayllo aledaño a las riberas del río Chillón, Lima, Perú. Las hojas de *U. tomentosa* fueron adquiridas en un centro naturista de la selva, Perú. El material vegetal colectado fue expuesto a la luz del sol para su secado, luego fue triturado y pulverizado con ayuda de un mortero y pilón en partículas muy pequeñas. Luego de moler las plantas se pasó por un tamizador para obtener un polvo fino (Ayala *et al.*, 2017).

Extracción alcohólica: En un recipiente conteniendo 500 mL de alcohol etílico al 96% se le agregó 100 g del material vegetal seco y se procedió a la maceración durante siete días a temperatura ambiente. Luego se realizó la filtración de los extractos con un tamizador. Se obtuvieron 400 mL de extracto etanólico de *P. major*, *U. tomentosa* y *E. globulus* al 20%.

Extracción acuosa: Se agregaron 60 g de material seco y pulverizado de cada planta en un recipiente

con 300 mL de agua mar filtrada y esterilizada. Luego se vertió el extracto en un recipiente y se mantuvo durante siete días en reposo a temperatura ambiente protegido de la luz. La preparación fue filtrada en un tamizador y se obtuvieron 200 mL de extracto acuoso de *P. major*, *U. tomentosa* y *E. globulus* al 20%.

Todos los extractos fueron guardados y rotulados en frascos ámbar y se conservaron entre 5° C a 10° C hasta su utilización (Iannacone *et al.*, 2016).

Enjuague alcohólico: En un recipiente con 200 mL de agua purificada se agregó 50 mg de lauril sulfato, seguidamente se agregaron 36 mL de glicerina y se agitó con una varilla. Se agregó 64 mL del extracto etanólico vegetal a la mezcla y por último 50 mg del colorante.

Enjuague acuoso: En un recipiente con 200 mL de agua purificada se agregó 50 mg de lauril sulfato, y seguidamente se agregan 60 mL de glicerina. Se adhirió 64 mL del extracto acuoso vegetal a la mezcla y por último 200 mg de colorante.

Para ambos enjuagues, los colorantes naturales empleados fueron el amarillo (Curcumina, E-100i, CAS 458-37-7) para el de *P. major*, el verde (Verde clorofila, E-140i, CAS 1406-65-1) para el de *E. globulus* y el naranja (Bixina, E-106b, CAS 6983-79-5) para *U. tomentosa* (N° 139-2012-DIGEMID-DG-MINSA). Todos estos ingredientes fueron utilizados para preservar y mejorar la calidad de los enjuagues, sus cantidades fueron aplicadas según el rango estipulado en sus hojas de seguridad y su adición no interfirió con la acción de las plantas medicinales.

Artemia franciscana

Los quistes de fueron lavados con agua destilada durante 1 h, luego para su escarificación se utilizó 3 mL de hipoclorito de sodio hasta observar una coloración naranja en los quistes, una vez escarificados se filtraron los huevos y se enjuagaron varias veces para eliminar el hipoclorito. Para la eclosión de los quistes de *Artemia*, se preparó un recipiente con agua de mar esterilizada bien oxigenada y se mantuvieron durante 48 h bajo régimen continuo de luz. Luego de la eclosión se esperaron 24 h más para utilizar las artemias en el ensayo, ya que es en este tiempo que maduraron a un estado larval naupliar II.

Después de la incubación, se colocó una fuente de luz a un lado del recipiente para atraer a las larvas II y separarlas de los huevos aún sin eclosionar. Las artemias se trasladaron a los pocillos de ensayo utilizando una pipeta Pasteur. El número de larvas II colectadas y añadidas cada placa fue determinada utilizando un microscopio estereoscópico (Iannacone *et al.*, 2016).

El ensayo consistió en exponer solo a las larvas del nauplio II instar a cinco concentraciones crecientes de los enjuagues alcohólicos y acuosos de las tres plantas (*P. major*, *U. tomentosa* y *E. globulus*) durante 24 h y 48 h de exposición a temperatura ambiente y bajo un régimen continuo de luz. En total se realizaron seis ensayos experimentales (tres enjuagues alcohólicos y tres enjuagues acuosos). Para cada ensayo se prepararon 24 pocillos de 20 mL cada uno, 20 pocillos con las diluciones de los enjuagues sobre agua de mar y cuatro pocillos con los controles de agua de mar.

Se añadió 10 larvas de nauplius II instar de *A. franciscana* en cada pocillo. Al finalizar las 24 h y 48 h de exposición, se contó el número de organismos muertos y se calculó el porcentaje de mortandad. Las larvas se consideraron muertas si no exhibieron movimiento durante 20 seg de observación al microscopio estereoscópico (Iannacone *et al.*, 2016).

Procesamiento y análisis de datos

Los datos fueron vertidos al programa Windows Excel 2012 para su procesamiento. El análisis de estos datos se realizó en SPSS versión 20,00. La eficacia de los ensayos se evaluó mediante un análisis ANDEVA de dos vías, y una prueba *a posteriori* de Tukey. La concentración letal media (CL₅₀) se calculó mediante el modelo EPA Probit versión 1.5 (Iannacone *et al.*, 2016). El grado de toxicidad de los enjuagues alcohólicos y acuosos en *A. franciscana* se definió según categorías de toxicidad empleando el índice de toxicidad de Meyer que considera: tóxico (CL₅₀ < 1000 ug·mL⁻¹) y no tóxico (CL₅₀ > 1000 ug·mL⁻¹) (Meyer *et al.*, 1982; Hamadi *et al.*, 2014). De igual forma se usó el índice de toxicidad de Clarkson: altamente tóxico (CL₅₀ de 0 a 100 ug·mL⁻¹), ligeramente tóxico (CL₅₀ de 100 a 500 ug·mL⁻¹), poco tóxico (CL₅₀ de 500 a 1000 ug·mL⁻¹), y no tóxico (CL₅₀ > 1000 ug·mL⁻¹) (Clarkson *et al.*, 2004; Hamadi *et al.*, 2014).

RESULTADOS

Las Tablas 1 al 3 nos muestran los efectos tóxicos de los enjuagues alcohólicos de *P. major*, *E. globulus* y *U. tomentosa* sobre la mortandad de nauplios de II instar de *A. franciscana* a 24 h y 48 h de exposición. A 24 h de exposición el enjuague bucal alcohólico más tóxico sobre *A. franciscana* resultó ser *E. globulus* y a 48 h de exposición fue *U. tomentosa*. Se observó para los tres enjuagues efectos significativos diferentes del control desde 533,12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 24 h y 48 h de exposición.

Las Tablas 4 al 6 nos indican los efectos tóxicos de los enjuagues acuosos de *P. major*, *E. globulus* y *U. tomentosa* sobre la mortandad de nauplios de II instar de *A. franciscana* a 24 h y 48 h de exposición. A 24 h de exposición el enjuague bucal acuoso más tóxico sobre *A. franciscana* resultó ser *P. major* y a 48 h de exposición fue *E. globulus*. Se observó para los enjuagues con *P. major* y *U. tomentosa* efecto diferentes del control desde 493,75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 24 h y 48 h de exposición.

Según el índice de toxicidad de Meyer a 24 h de exposición solamente el enjuague bucal alcohólico a base de *E. globulus* resultó ser tóxico, y a 48 h de exposición los tres enjuagues bucal alcohólicos fueron tóxicos (Tabla 7). En el caso del enjuague bucal acuoso a base de *P. major* resultó ser tóxico, y a 48 h de exposición los tres enjuagues bucales acuosos fueron considerados tóxicos según el índice de Meyer (Tabla 7).

En cambio, según el índice de toxicidad de Clarkson a 24 h de exposición solamente el enjuague bucal alcohólico a base de *E. globulus* resultó ser poco tóxico, y a 48 h de exposición los tres enjuagues bucal alcohólicos fueron poco tóxicos (Tabla 8). En el caso del enjuague bucal acuoso a base de *P. major* resultó ser poco tóxico, y a 48 h de exposición los enjuagues acuosos bucales *P. major* y *U. tomentosa* fueron considerados poco tóxicos, y el enjuague acuoso bucal de *E. globulus* fue considerado ligeramente tóxico según el índice de Clarkson (Tabla 8).

Tabla 1. Efecto tóxico del enjuague bucal alcohólico de *Plantago major* “Llantén” sobre la mortandad (%) de nauplios de II instar de *Artemia franciscana* a 24h y 48h de exposición.

ug·mL ⁻¹	% 24h			% 48h		
	mortandad	DE ±	Sig	mortandad	DE ±	Sig
0	0	10	a	0	9,57	a
533,12	28,95	9,57	b	51,43	9,57	b
1066,25	26,32	11,54	b	74,29	9,57	c
2132,5	68,42	14,14	c	80	9,57	cd
4265	89,47	11,54	cd	100	0,0	d
8530	100	0,0	d	100	0,0	d
F	51,80			71,45		
P	0,00			0,00		
CL ₅₀	1874,3			881,68		
CL ₅₀ límite inferior	1283,8			232,62		
CL ₅₀ límite superior	2464,7			1530,7		

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los promedios son estadísticamente iguales ($P > 0,05$, según Tukey). DE = desviación estándar. CL₅₀ = Concentración letal media en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Sig = significancia.

Tabla 2. Efecto tóxico del enjuague bucal alcohólico de *Eucalyptus globulus* “Eucalipto” sobre la mortandad (%) de nauplios de II instar de *Artemia franciscana* a 24h y 48 h de exposición.

ug·mL ⁻¹	% 24h			% 48h		
	mortandad	DE ±	Sig	mortandad	DE ±	Sig
0	0	9,57	a	0	11,54	a
533,12	32,43	12,58	b	32,14	17,07	b
1066,25	72,97	5,77	c	70,57	12,91	c
2132,5	94,59	5,77	d	100	0,00	c
4265	91,89	9,57	cd	96,43	5,00	c
8530	100	0,00	d	100	0,00	c
F	82,2			33,85		
P	0,00			0,00		
CL ₅₀	651,20			803,01		
CL ₅₀ límite inferior	402,75			709,88		
CL ₅₀ límite superior	1052,91			896,15		

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los promedios son estadísticamente iguales ($P > 0,05$, según Tukey). DE = desviación estándar. CL₅₀ = Concentración letal media en ug·mL⁻¹. Sig = significancia.

Tabla 3. Efecto tóxico del enjuague bucal alcohólico de *Uncaria tomentosa* “Uña de gato” sobre la mortandad (%) de nauplios de II instar de *Artemia franciscana* a 24h y 48h de exposición.

ug·mL ⁻¹	% 24h			% 48h		
	mortandad	DE ±	Sig	mortandad	DE ±	Sig
0	0	9,57	a	0	9,57	a
533,12	37,89	9,57	b	48,48	5,00	b
1066,25	45,95	11,54	b	51,52	14,14	b
2132,5	59,46	9,57	bc	75,76	8,16	c
4265	78,38	8,16	c	96,97	5,00	cd
8530	94,59	5,77	c	100	0,00	d
F	44,46			55,94		
P	0,00			0,00		
CL ₅₀	1109,5			751,74		
CL ₅₀ límite inferior	629,43			467,66		
CL ₅₀ límite superior	1955,72			1208,39		

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los promedios son estadísticamente iguales ($P > 0,05$, según Tukey). DE = desviación estándar. CL₅₀ = Concentración letal media en ug·mL⁻¹. Sig = significancia.

Tabla 4. Efecto tóxico del enjuague bucal acuoso de *Plantago major* “Llantén” sobre la mortandad (%) de nauplios de II instar de *Artemia franciscana* a 24h y 48 h de exposición.

ug·mL ⁻¹	% 24h			% 48h		
	mortandad	DE ±	Sig	mortandad	DE ±	Sig
0	0	10,00	a	0	9,57	a
493,75	39,47	9,57	b	54,84	5,77	b
987,5	39,47	9,57	b	67,74	10,00	bc
1975	65,79	9,57	c	80,65	5,77	c
3950	92,11	5,00	d	96,77	5,00	c
7900	96,84	5,00	d	100	0,00	c
F	67,72			69,17		
P	0,00			0,00		
CL ₅₀	942,29			501,60		
CL ₅₀ límite inferior	584,03			287,83		
CL ₅₀ límite superior	1520,34			874,14		

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los promedios son estadísticamente iguales ($P > 0,05$, según Tukey). DE = desviación estándar. CL₅₀ = Concentración letal media en ug·mL⁻¹. Sig = significancia.

Tabla 5. Efecto tóxico del enjuague bucal acuoso de *Eucalyptus globulus* “Eucalipto” sobre la mortandad (%) de nauplios de II instar de *Artemia franciscana* a 24h y 48 h de exposición.

ug·mL ⁻¹	% 24h			% 48h		
	mortandad	DE ±	Sig	mortandad	DE ±	Sig
0	0	15,00	a	0	12,58	a
493,75	20	8,16	ab	51,61	12,58	b
987,5	34,29	9,57	b	61,29	8,16	b
1975	68,57	9,57	c	74,19	8,16	b
3950	85,71	9,57	cd	100	0,00	c
7900	100	0,00	d	100	0,00	c
F	50,29			44,53		
P	0,00			0,00		
CL ₅₀	1288,38			470,68		
CL ₅₀ límite inferior	839,86			196,71		
CL ₅₀ límite superior	1976,43			1126,23		

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los promedios son estadísticamente iguales ($P > 0,05$, según Tukey). DE = desviación estándar. CL₅₀ = Concentración letal media en ug·mL⁻¹. Sig = significancia.

Tabla 6. Efecto tóxico del enjuague bucal acuoso de *Uncaria tomentosa* “Uña de gato” sobre la mortandad (%) de nauplios de II instar de *Artemia franciscana* a 24h y 48h de exposición.

ug·mL ⁻¹	% 24h			% 48h		
	mortandad	DE ±	Sig	mortandad	DE ±	Sig
0	0	5,57	a	0	9,57	a
493,75	23,68	9,57	b	19,35	5,00	b
987,5	34,21	9,57	bc	67,74	5,77	c
1975	47,37	8,16	c	77,42	9,57	c
3950	71,05	9,57	d	97,96	5,00	d
7900	92,11	5,00	e	100	0,00	d
F	59,55			92,62		
P	0,00			0,000		
CL ₅₀	1609,64			896,87		
CL ₅₀ límite inferior	968,11			608,56		
CL ₅₀ límite superior	2676,28			1322,00		

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los promedios son estadísticamente iguales ($P > 0,05$, según Tukey). DE = desviación estándar. CL₅₀ = Concentración letal media en ug·mL⁻¹. Sig = significancia.

Tabla 7. Clasificación de toxicidad según índice de toxicidad de Meyer de los enjuagues alcohólicos y acuosos bucales a las 24h y 48 h según CL₅₀ de *Artemia franciscana*.

Enjuagues	Enjuague bucal	CL ₅₀	Clasificación	CL ₅₀	Clasificación
		(ug·mL ⁻¹) 24 h	de toxicidad 24 h	(ug·mL ⁻¹) 48 h	de toxicidad 48 h
alcohólicos	<i>Plantago major</i>	1874,3	no tóxico	881,68	tóxico
	<i>Eucalyptus globulus</i>	651,20	tóxico	803,01	tóxico
	<i>Uncaria tomentosa</i>	1109,5	no tóxico	751,74	tóxico
acuosos	<i>Plantago major</i>	942,29	tóxico	501,60	tóxico
	<i>Eucalyptus globulus</i>	1288,38	no tóxico	470,68	tóxico
	<i>Uncaria tomentosa</i>	1609,64	no tóxico	896,87	tóxico

Categorías de toxicidad según índice de toxicidad de Meyer: tóxico (CL₅₀ < 1000 ug·mL⁻¹) y no tóxico (CL₅₀ > 1000 ug·mL⁻¹) (Meyer *et al.*, 1982).

Tabla 8. Clasificación de toxicidad según índice de toxicidad de Clarkson de los enjuagues alcohólicos y acuosos bucales a las 24h y 48 h según CL₅₀ de *Artemia franciscana*.

Enjuagues	Enjuague bucal	CL ₅₀	Clasificación	CL ₅₀	Clasificación
		(ug·mL ⁻¹) 24 h	de toxicidad 24 h	(ug·mL ⁻¹) 48 h	de toxicidad 48 h
alcohólicos	<i>Plantago major</i>	1874,3	no tóxico	881,68	poco tóxico
	<i>Eucalyptus globulus</i>	651,20	poco tóxico	803,01	poco tóxico
	<i>Uncaria tomentosa</i>	1109,5	no tóxico	751,74	poco tóxico
acuosos	<i>Plantago major</i>	942,29	poco tóxico	501,60	poco tóxico
	<i>Eucalyptus globulus</i>	1288,38	no tóxico	470,68	ligeramente tóxico
	<i>Uncaria tomentosa</i>	1609,64	no tóxico	896,87	poco tóxico

Categorías de toxicidad según índice de toxicidad de Clarkson: altamente tóxico (CL₅₀ de 0 a 100 ug·mL⁻¹), ligeramente tóxico (CL₅₀ de 100 a 500 ug·mL⁻¹), poco tóxico (CL₅₀ de 500 a 1000 ug·mL⁻¹), y no tóxico (CL₅₀ > 1000 ug·mL⁻¹) (Clarkson *et al.*, 2004).

DISCUSIÓN

La presente investigación cumplió con evaluar la toxicidad aguda de los enjuagues bucales a base de tres plantas naturales como parte de una serie de pruebas preclínicas. Como protocolo es necesario conducir estudios previos a la evaluación en seres humanos, debido a que se han registrado casos de toxicidad generada por distintas especies herbarias (Kember & Rengifo, 1995, Tovar, 2001).

Dentro de los ensayos de toxicidad encontramos el de letalidad sobre *A. franciscana*, que ha sido utilizado en diferentes investigaciones de toxicidad aguda como plantas, compuestos químicos con acción farmacológica, metales, etc. (Sorgeloos *et al.*, 1978; Pino & Jorge, 2010). Este tipo de ensayo mostró resultados similares al ser comparado con estudios de toxicidad en ratones (Sorgeloos, 1978). En el ámbito odontológico también se ha empleado este modelo biológico, aunque no muy frecuentemente, para detectar toxicidad de los materiales dentales como ionómeros de vidrio, resinas y compómeros. Se han realizado extractos alcohólicos de estos materiales para evaluar su toxicidad y se concluyó que los materiales más tóxicos fueron los compómeros (Pino & Jorge, 2010).

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación se ha determinado que los enjuagues bucales elaborados a base de plantas naturales poseen cierta toxicidad sobre nauplios de II instar de *A. franciscana* que varían de acuerdo a la concentración del enjuague bucal. No existen antecedentes que podamos comparar directamente con nuestra investigación, pero sí estudios similares que en su mayoría evaluaron la toxicidad de estos extractos de estas plantas (Ayala *et al.*, 2017).

Respecto a los ingredientes comunes en los enjuagues bucales (lauril sulfato, glicerina, colorantes, agua purificada), todos fueron agregados en medidas por debajo de sus niveles de toxicidad, por lo que se entiende que no son los causales del nivel de letalidad promedio sobre el ensayo de *A. franciscana* (Toğulga, 1998; Hayyan *et al.*, 2013).

En el caso de los enjuagues bucales acuosos, el que

presentó mayor toxicidad según la escala de Clarkson fue el elaborado a base de *E. globulus*, lo que corrobora lo hallado por Flores *et al.* (1999), quienes realizaron pruebas de toxicidad aguda del aceite esencial de Eucalipto sobre *Artemia salina* (Linnaeus, 1758). Además, existen otras investigaciones realizadas en ratones que también encontraron cierta toxicidad luego de la administración del extracto de eucalipto. Algunos de los síntomas que manifestaron los roedores fueron mareos, náuseas y diarreas. Esta planta presenta dentro de su composición sustancias activas que podrían ser responsables de su toxicidad, como las aucubinas y politerpenos (Sugimoto *et al.*, 2005).

Sobre los enjuagues bucales acuosos, resultó ser poco tóxico el elaborado a base de *P. major*. Salama *et al.* (1996) hallaron niveles de toxicidad por debajo de los 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Los estudios suponen que la extracción acuosa de *P. major* presenta componentes tóxicos; por ende, es necesario continuar con investigaciones para la identificación de estas sustancias tóxicas.

Respecto a los enjuagues bucales a base de *U. tomentosa*, el efecto tóxico como enjuague alcohólico o acuoso fue poco tóxico (Quintela, 2003), lo que apoya lo encontrado por Yunis-Aguinaga *et al.* (2014) que probaron la baja toxicidad de la *U. tomentosa* sobre otros organismos acuáticos como los peces.

Los enjuagues a base de eucalipto y de llantén fueron en general los más tóxicos para la prueba sobre *A. franciscana*. Estos hallazgos coinciden con los resultados que usaron otros sujetos de prueba como ratones, peces, conejos, etc. Al considerar a los enjuagues bucales como productos de uso odontológico debemos tomar en cuenta que es necesario realizar estudios diversos para descartar todo tipo de toxicidad, efectos adversos y otras características que contraindiquen su uso. Además no se debe olvidar que si se trabaja por debajo de los niveles de toxicidad que encontramos no podemos asegurar la efectividad de sus propiedades. Los diferentes materiales usados en la terapia odontológica pueden ser analizados con ensayos de toxicidad para comprobar su inocuidad (Swetha *et al.*, 2015; Yalcin *et al.*, 2017). Un ejemplo de ello fue la investigación conducida por Milhem *et al.* (2008), que evaluó la toxicidad de

diferentes materiales de restauración comúnmente usados como las resinas, el ionómero de vidrio y compómeros.

Al finalizar se encontró en general poca toxicidad en estos materiales, lo que demuestra que se podrían estar usando enjuagues bucales con cautela. Los enjuagues bucales a base de *P. major*, *U. tomentosa* y *E. globulus* son poco tóxicos según la escala de Clarkson. Los enjuagues alcohólicos (751,74-881,68) en base a la CL_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) resultaron igual de tóxicos que los enjuagues sin alcohol (470,68- 894,87). El enjuague bucal alcohólico más tóxico fue el de *U. tomentosa*, y el enjuague bucal acuoso más tóxico fue el de *E. globulus*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayala, H.; Iannacone, J. & Alvariano, L. 2017. Toxicidad de cinco extractos acuosos botánicos sobre *Panagrellus redivivus* (Nematoda: Panagrolaimidae), *Daphnia magna* (Crustacea; Daphniidae), *Lemna minor* (Araceae) y *Raphanus sativus* (Brassicaceae). *Neotropical Helminthology*, 11: 139-155.
- Baniamam, M. 2014. Determination of lethal concentration (LC_{50}) values of Vanadium and toxicity effect on the growth of *Artemia urmiana* and *A. franciscana*. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 1: 1-8.
- Brack, A. 1999. *Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú*. Cuzco. Centro de estudios regionales andino "Bartolomé de las Casas" PNUD. 550 p.
- Cabieses, F. 1993. *Apuntes de medicina tradicional*. Lima, Perú. Concytec.
- Calixto-Cotos, M.R. 2006. Plantas medicinales utilizadas en Odontología (Parte 1). *Kiru*, 3: 80-85.
- Carballo, J.L.; Hernández-Inda, Z.; Pérez, P. & García-Grávalos, M.D. 2002. A comparison between two brine assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2: 17.
- Clarkson, C.; Maharaj, V.J.; Crouch, N.R.; Grace, O.M.; Pillay, P.; Matsabisa, M. G.; Bhagwandin, N.; Smith, P.J. & Folb, P.I. 2004. *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalized in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 92: 177-191.
- Desmarchelier, C. & Schaus, W. F. 2000. *60 plantas medicinales de la amazonia peruana*. Lima-Perú.
- Dvorak, P.; Benova, K. & Vitek, J. 2012. Alternative biotest on *Artemia franciscana*. In: *Ecotoxicology*. Begum, G. (ed.). Intech: Available from: http://cdn.intechopen.com/pdfs/27522/InTech-Alternative_biotest_on_artemia_franciscana.pdf
- Dumitrascu, M. 2011. *Artemia salina*. *Balneo-Research Journal*, 2: 119-122.
- Flores, Q.; Velasco, A.; Irahola, P. & Gimenez, A. 1999. Aceites esenciales con actividad citotóxica como indicador de propiedades insecticidas. *Biofarbo*, 7: 35-37.
- Gadir, S.A. 2012. Assessment of bioactivity of some Sudanese medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4: 5145-5148.
- García, G.; Coto-Morales, T.; Soto-Rodríguez, G.A. & Pazos-Sanou, L. 2003. Toxicidad sub-crónica y prueba de irritabilidad ocular del extracto acuoso de las hojas de *Plantago major* (Plantaginaceae). *Revista de Biología Tropical*, 51: 635-638.
- Hamidi, MR.; Jovanova, B. & Kadifkova-Panovska, T. 2014. Toxicological evaluation of the plant products using brine shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 60: 9-18.
- Hayyan, M.; Hashim, M.A.; Al-Saadi, M.A.; Hayyan, A.; AlNashef, I.M. & Mirghani, ME. 2013. Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere*, 93: 455-459.
- Iannacone, J.; Alvariano, L.; Valle Riestra, V.; Ymaña, B.; Argota, G.; Fimia, R.; Carhuapoma, M. & Castañeda, L. 2016. Toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre larvas del camarón salino *Artemia franciscana* (Crustacea: Artemiidae). *Revista de Toxicología*, 33: 31-38.
- Kember, M. & Rengifo, E. 1995. *Plantas*

- medicinales de uso popular en la Amazonía Peruana*. Agencia Española de Cooperación Internacional. Lima- Perú.
- Krenmayr, I.; Casas, R.D.; Chaytor, J.; Graf, B. & Sánchez, C.J. 2000. *Plantas en la cultura andina. Descripción. Medicina. Alimentación. Cultura*. Huancayo, Perú: CEDEPAS. 297 p.
- Krishnaraju, A.V.; Rao, T.V.N.; Sundararaju, D.; Vanisree, M.; Tsay, H.S. & Subbaraju, G.V. 2005. Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. International Journal of Applied Science and Engineering, 3: 125-134.
- Lagarto-Parra, A.; Silva-Yhebra, R.; Guerra-Sardiñas, & Iglesias-Buela, L. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. Phytomedicine, 8: 395-400.
- Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, J.E.; Nichols, D.E. & McLaughlin, J.L. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. Journal of Medicinal Plant Research, 45: 31-34.
- Milhem, M.M.; Al-Hiyasat, A. & Darmani, H. 2008. Toxicity testing of restorative dental Materials using brine shrimp larvae (*Artemia salina*). Journal of Applied Oral Science, 16: 297-301.
- Pelka, M.; Danzl, C.; Distler, W. & Petschelt, A. 2000. A new screening test for toxicity testing dental materials. Journal of Dentistry, 28: 341-345.
- Pino, O. & Jorge, F. 2010. ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. Revista de Protección Vegetal, 22: 34-43.
- Quintela, J. 2003. Uña de gato. Revista de fitoterapia, 3: 5-16.
- Rajabi, S.; Ramazani, A.; Hamidi, M. & Naji, T. 2015. *Artemia salina* as model organism in toxicity assessment of nanoparticles. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 23: 20.
- Ramachandram, S.; Vamsikrishna, M.; Gowthami, K.V.; Heera, B. & Dhanaraju, M.D. 2011. Assessment of cytotoxic activity of *Agave cantula* using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality bioassay. Asian Journal of Scientific Research, 4: 90-94.
- Salama, A.; Hinestrosa, A.P. & Chaves R.M.P. 1996. Fito y bioanálisis de algunas plantas utilizadas en medicina popular con posible actividad farmacológica. Revista colombiana de ciencias Químico Farmacéuticas, 25: 44-51.
- Salgado, L. 2001. *La Artemia y su cultivo en el Perú*. Universidad Nacional de Piura. Facultad de Ciencias Biológicas. Piura, Perú. 133 p.
- Sambeat V. 1999. *Fitoterapia. Vademecum de tratamiento*. España. Universidad de León.
- Santa-María, A.; Lopez, A.; Díaz, M.M.; Albán, J.; Galán de Mera, A.; Vicente Orellana, J.A. & Pozuelo, J.M. 1997. Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by bioassays *in vitro*. Journal of Ethnopharmacology, 57:183-187.
- Sarah, Q.S.; Chowdhury, F.A. & Misbahuddin, M. 2017. Brine shrimp lethality assay. Bangladesh Journal of Pharmacology, 12: 186-189.
- Schmalz, G. 1994. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. Journal of Dentistry Supplement 2, 22: S6-S22.
- Sobrino-Figueroa, A. 2015. Toxic effect of emerging pollutants in juveniles of the freshwater gastropod *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). American Malacological Bulletin, 33: 1-6.
- Sorgeloos, P. 1978. The use of artemia nauplii for toxicity test. A critical analysis. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2: 249-255.
- Sugimoto, K.; Suzuki, J.; Nakagawa, K.; Hayashi, S.; Enomoto, T.; Fujita, T.; Yamaji, R.; Inui, H. & Nakano, Y. 2005. *Eucalyptus* leaf extract inhibits intestinal fructose absorption, and suppresses adiposity due to dietary sucrose in rats. British Journal of Nutrition, 93:957-963.
- Swetha, B.; Mathew, S.; Murthy, B.V.; Shruthi, N. & Bandhi, S.H. 2015. Determination of biocompatibility. A review. International Dental of Medical Journal of Advances Research, 1: 1-6.
- Toğulga, M. 1998. The short-term toxicity of two toxicants to *Artemia* nauplii. Turkish Journal of Zoology, 22: 259-266.

- Tovar, O. 2001. *Plantas medicinales del valle del mantaro*. Lima, Perú. Concytec.
- Yalcin, M.; Ulker, M. Ulker, E. & Sengum, A. 2013. Evaluation of cytotoxicity of six different composites with the methyl tetrazolium test methods. *European Journal of General Dentistry*, 2: 292-295.
- Yunis-Aguinaga, J.; Claudiano, G.S.; Marcusso, P.F.; Ikefuti, C.; Ortega, G.G.; Eto, S.F.; da Cruz, C.; Moraes, J.R.E.; Moraes, F.R. &

Fernandes, J.B.K. 2014. Acute toxicity and determination of the active constituents of aqueous extract of *Uncaria tomentosa* Bark in *Hyphessobrycon eques*. *Journal of Toxicology*, 2014: Article ID 412437.

Received July 2, 2017.
Accepted October 14, 2017.