

Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L.

Preliminary evaluation of *Sida rhombifolia* L. toxicity, genotoxicity and antimicrobial activity

Keile Brugés*, María Teresa Reguero Reza*

Resumen

La actual predisposición a consumir productos naturales y, en muchas regiones, la difícil disponibilidad y accesibilidad a los medicamentos han llevado a las poblaciones del mundo a buscar otras alternativas para aliviar sus dolencias. Una de las más difundidas ha sido el regreso a la medicina ancestral, lo cual ha provocado un aumento en el consumo de fitoterapéuticos. En Colombia, el uso de los fitomedicamentos está muy extendido y, dentro de ellos, en esta investigación se seleccionó la planta *Sida rhombifolia* L. a la cual se le realizó la evaluación de la toxicidad de extractos y fracciones utilizando como organismos de prueba *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* y *Artemia salina*. La actividad biológica fue evaluada mediante la prueba de sensibilidad a antimicrobianos y la genotoxicidad con el ensayo Cometa. Los ensayos de toxicidad aguda con los organismos de prueba muestran que los extractos acuosos son prácticamente no tóxicos ($CL_{50} > 1000$ ppm), lo cual sugiere que su uso en forma de infusión es seguro. Los extractos etanólicos y las fracciones de acetato de etilo y cloroformo presentaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* que puede ser atribuida a los metabolitos secundarios (terpenoides, flavonoides) que están presentes en esta especie. Los extractos etanólicos presentaron una importante actividad genotóxica sobre los linfocitos en el ensayo Cometa, siendo el extracto etanólico de raíces el que presenta mayor genotoxicidad (CL_{50} 35 ppm). Es importante señalar que el extracto acuoso de hojas presenta una baja genotoxicidad (CL_{50} 900 ppm), lo cual es relevante si se toma en consideración que es la parte de la planta tradicionalmente utilizada por las comunidades indígenas ubicadas en la Sierra Nevada de Santa Marta.

Palabras clave: *Sida* sp, plantas medicinales, bioensayos de toxicidad

Abstract

The current tendency to consume more natural products and difficult availability of and access to medicines in many regions has led the world's population to seek other alternatives for relieving their ailments. A return to ancestral medicine has been one of the most widely used alternatives in Colombia, provoking increased phytotherapeutic consumption. The *Sida rhombifolia* L. plant was selected for this investigation; *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* and *Artemia salina* extracts and fractions were used as test organisms for toxicity evaluation. Biological activity was evaluated by sensitivity to antimicrobial test and genotoxicity by Comet assay. Acute toxicity with test organisms showed that aqueous extracts were practically non-toxic ($CL_{50} > 1,000$ ppm), suggesting that they can be safely used in infusions. Ethanol extracts and ethyl acetate and chloroform fractions revealed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudo-*

* Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, Edificio Manuel Ancizar. Fax 316 54 15. Teléfono 316 50 00 ext. 16963. kyburguesp@unal.edu.co

monas aeruginosa; this could have been due to secondary metabolites (terpenoids, flavonoids) present in these species. Ethanol extracts presented important genotoxicity (CL₅₀ 35 ppm); it is worth pointing out that the leaves' aqueous extracts displayed low genotoxicity (CL₅₀ 900 ppm) which is important when taking into account that they are the part of the plant traditionally used by indigenous communities located in the Sierra Nevada de Santa Marta in Colombia.

Key words: *Sida sp*, medicinal plants, toxicity bioassays.

Recibido: julio 10 de 2006

Aceptado: julio 5 de 2007

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la búsqueda de alternativas terapéuticas dentro de los productos naturales para aliviar o curar sus dolencias o afecciones se ha intensificado. La obtención de nuevos fármacos a partir de la biodiversidad es uno de los ejercicios científicos más importantes, tomando en consideración la potencialidad de encontrar en la biodiversidad nuevas estructuras que puedan constituirse en cabezas de serie, y debido a la creciente tendencia de la población a consumir productos fitoterapéuticos.

Este tipo de investigaciones presenta un reto de grandes proporciones, puesto que la utilización de estos productos no sólo debe estar basada en el conocimiento o la sabiduría popular, sino que se debe garantizar su uso seguro, ya que es frecuente relacionar la palabra natural con inocuo, y desconocer las posibles reacciones adversas que estos productos pueden presentar.

Sida rhombifolia L. (escobilla, escoba negra) pertenece a la familia *Malvaceae* y es utilizada por las comunidades de la Sierra Nevada de Santa Marta (Colombia) para el tratamiento del mal de orín y riñones, enfermedades de la piel, hemorragias, dolor de dientes, diarrea, gastritis y como analgésico para controlar la fiebre (Coelho de Souza, 2004; Harsha, 2003; Barros, 2000).

Algunos de los metabolitos secundarios que han sido aislados de *Sida rhombifolia* L. son: pseudoefedrina, beta-feniletilamina, efedrina, vascina y vascinol. Adicionalmente, se han reportado beta-sitosterol y otros compuestos derivados de colina. En el tallo se ha informado la presencia de hipaforina y alcaloides indólicos (Duke, 1999; Dinan, 2001).

Como un aporte a la utilización segura de plantas medicinales, en el presente trabajo se realizó la evaluación preliminar de la toxicidad de extractos y fracciones de *Sida rhombifolia* L. utilizando como organismos de prueba *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* y *Artemia salina*; la genotoxicidad se puso de manifiesto a través del ensayo Cometa, y para la determinación de la actividad antimicrobiana se emplearon *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal fue recolectado en la finca El Laurel ubicada en el corregimiento de Minca, sector oriente, vereda Marinca en la Sierra Nevada de Santa Marta. Se conservó un ejemplar con hojas completas, flores o inflorescencias, el cual fue remitido al Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, para su clasificación botánica. El material en mención fue clasificado como *Sida rhombifolia* L., familia *Malvaceae*, y código COL507967, por el curador general Julio Betancur.

Preparación de extractos

Las partes aéreas de la planta se separaron en tallos, hojas y raíces, los cuales fueron sometidos a secado en estufa de aire circulante a temperatura entre 40-45 °C durante tres días. El material vegetal seco y molido (hojas, tallos y raíces) se extrajo por percolación con etanol del 96% hasta agotamiento total. El extracto etanólico se concentró al vacío

utilizando rotaevaporador. Posteriormente, el material vegetal extraído con etanol se secó y se extrajeron 100 g de cada una de las partes (hojas, tallos y raíces) con 700 mL de agua caliente; se filtró y se liofilizó. A partir de 20 g del extracto etanólico de partes aéreas de *Sida rhombifolia* L. se hizo un fraccionamiento utilizando extracciones sucesivas con los siguientes disolventes: éter de petróleo, acetato de etilo, cloroformo, butanol y agua. Las fracciones obtenidas con los distintos disolventes se evaporaron a sequedad en rotaevaporador.

Marcha fitoquímica

Para la marcha fotoquímica se partió de 50 g del material vegetal pulverizado (tallos, hojas y raíces) siguiendo el protocolo diseñado por Sanabria (1983).

Bioensayos

Las pruebas de toxicidad aguda se realizaron siguiendo los protocolos de la Environmental Protection Agency (EPA) (2002), del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (Cyted) (1995), y de Trottier y cols. (1997). Se construyó, para todos los organismos de prueba, la carta de control de sensibilidad utilizando dicromato de potasio como control positivo en las siguientes concentraciones (*D. magna* y *H. attenuata*: 1,5, 1; 0,5; 0,10; 0,05 ppm, y *A. salina*: 10, 8, 5, 1 ppm). La variable de respuesta fue la muerte o inmovilidad de los organismos de prueba observada a las 24 horas para *Daphnia magna* y *Artemia salina*; para *Hydra attenuata* se observaron los cambios morfológicos que se presentaron a las 72 horas. En los ensayos de toxicidad aguda se calculó el valor de CE_{50} para *D. magna* y *A. salina*, y CL_{50} para *Hydra attenuata* utilizando el programa estadístico PROBIT. Las condiciones utilizadas para la realización de los bioensayos se describen en la tabla 1, y los resultados obtenidos se consignan en la tabla 4.

Las muestras para evaluar (extractos), y el patrón positivo (dicromato de potasio), se disolvieron utilizando el medio de cada organismo de prueba, y para los extractos etanólicos y acuosos de hojas, tallos y raíces de *Sida rhombifolia* L. se utilizó dimetil sulfóxido al 1% (DMSO) como cosolvente.

Con los datos obtenidos en los ensayos preliminares de extractos y el control positivo se calculó la CE_{50} o la CL_{50} , y tomando en consideración

los resultados obtenidos se montaron las pruebas definitivas utilizando 5 concentraciones para cada producto para evaluar, y 3 réplicas por cada concentración.

Actividad antibacteriana

Se siguió la técnica descrita por el Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS). Se ensayaron diferentes concentraciones (tabla 2) de los extractos etanólicos y acuosos, así como las fracciones de éter de petróleo, acetato de etilo, cloroformo, butanol y acuosa de *Sida rhombifolia* sobre las bacterias *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* 27853. El control de calidad a las cepas se realizó utilizando el método semi-automatizado de Microscan de Bayer. Para cada microorganismo se probó un antibiótico con una concentración y producción de un diámetro de halo conocido –*E. coli*: eftazidima (CAZ), Cefuroxima (CXM); *S. aureus*: Vancomicina (VA), Eritromicina (E); *P. aeruginosa*: Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO)–, se evaluó el DMSO al 100% cosolvente utilizado para solubilizar los extractos etanólicos y las fracciones que se probaron (NCCLS, 2006).

Ensayo Cometa

El ensayo se realizó utilizando 5 mL de sangre total citratada, y mediante gradiente de ficol histopaque se obtuvieron los linfocitos que se ajustaron a una concentración de 2×10^5 cel/ mL en PBS. En un tubo plástico para microcentrifuga se colocó 1 mL de cada compuesto para evaluar, y se adicionaron 0,5 mL de una suspensión ajustada de linfocitos. Los tubos se incubaron durante dos horas a 37 °C, protegidos de la luz, se centrifugaron a 6000 rpm por 10 min, se recuperó el pelet de linfocitos el cual se resuspendió en 100 μ L de PBS. Se adicionaron 90 μ L de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5%, y la mezcla se colocó sobre láminas de vidrio de 16 cm de largo por 8 cm de ancho precubiertas con agarosa de punto de fusión normal al 1%, y finalmente se adicionó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión, se dejaron gelificar completamente y se colocaron en solución lisis (0,23 M NaCl; 9 mM EDTA; 0,9 mM tris base; 1% Triton X-100; 10% DMSO; pH: 10,0 (Monroy, 2005) por 12 horas. El exceso de la solución de lisis se retiró mediante lavados con agua destilada y se colocaron en la cámara de electroforesis (Bio-

Tabla 1. Condiciones para los bioensayos de extractos de *Sida rhombifolia L.*

Ensayo	Daphnia magna		Hydra attenuata		Artemia salina	
	Preliminar	Definitivo	Preliminar	Definitivo	Preliminar	Definitivo
Extracto etanólico hojas Número de organismos Concentraciones (ppm)	5 1000-10	10 500-100	3 1000-10	5 75-10	10 1000-1	10 500-250
Extracto etanólico tallos Número de organismos Concentraciones (ppm)	5 1000-10	10 500-100	3 1000-10	5 75-10	10 1000-1	10 500-50
Extracto etanólico raíces Número de organismos Concentraciones (ppm)	5 1000-10	10 100-5	3 1000-10	5 75-10	10 1000-1	10 1000-100
Extracto acuoso hojas Número de organismos Concentraciones (ppm)	5 1000-10	10 > 1000	3 1000-10	5 1000-600	10 1000-1	10 1000-500
Extracto acuoso tallos Número de organismos Concentraciones (ppm)	5 1000-10	10 >1000	3 1000-10	5 500-250	10 1000-1	10 1000-500
Extracto acuoso raíces Número de organismos Concentraciones (ppm)	5 1000-10	10 >1000	3 1000-10	5 2000-1000	10 1000-1	10 1000-500

Tabla 2. Condiciones del ensayo de actividad antimicrobiana de extractos y fracciones de *Sida rhombifolia L.*

Extracto o fracción	Parte de la planta	Concentración sensidisco (µg)	<i>E. coli</i> Diámetro del halo (mm)	<i>S. aureus</i> Diámetro del halo (mm)	<i>P. aeruginosa</i> Diámetro del halo (mm)
Extracto etanólico	Hojas	500	NH	8,00	7,00
		250	NH	8,00	6,00
		100	NH	8,00	6,00
		50	NH	8,00	7,00
	Tallos	500	NH	8,00	8,00
		250	NH	7,00	8,00
		100	NH	9,00	6,00
		50	NH	8,00	6,00
	Raíz	500	NH	12,00	7,00
		250	NH	10,00	7,00
		100	NH	9,00	6,00
		50	NH	11,00	9,00

EVALUACIÓN PRELIMINAR DE TOXICIDAD, GENOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Extracto o fracción	Parte de la planta	Concentración sensidisco (µg)	<i>E. coli</i> Diámetro del halo (mm)	<i>S. aureus</i> Diámetro del halo (mm)	<i>P. aeruginosa</i> Diámetro del halo (mm)	
Extracto acuoso	Hojas	500	NH	7,00	7,00	
		250	NH	7,00	7,00	
		100	NH	9,00	9,00	
		50	NH	7,00	6,00	
	Tallos	500	NH	NH	8,00	
		250	NH	NH	9,00	
		100	NH	8,33	NH	
		50	NH	8,00	NH	
	Raíz	500	NH	8,00	8,00	
		250	NH	9,00	8,00	
		100	NH	NH	NH	
		50	NH	NH	NH	
Fracciones	Éter de petróleo	1000	NH	9,00	NH	
		500	NH	10,00	NH	
		250	NH	9,00	NH	
		125	NH	8,00	NH	
		1000	NH	8,00	NH	
		500	NH	12,00	NH	
		250	NH	10,00	NH	
		125	NH	9,00	NH	
	Acetato de etilo	1000	NH	10,00	NH	
		500	NH	9,00	NH	
		250	NH	10,00	NH	
		125	NH	10,00	NH	
	Cloroformo	1000	NH	10,00	NH	
		500	NH	9,00	NH	
		250	NH	8,00	NH	
		125	NH	9,00	NH	
	Butanol	1000	NH	NH	NH	
		500	NH	NH	NH	
		250	NH	NH	NH	
		125	NH	10,00	NH	
	Acuosa					
Tóxico de referencia	Antibióticos 30 (µg)		Ceftazidima (CAZ) 22,6	Vancomicina (VA) 18	Ceftazidima (CAZ) 22	
			Cefuroxima (CXM) 24,6	Eritromicina (E) 28	Ceftriaxona (CRO) 13,6	
Control negativo	DMSO		NH	NH	NH	

rad 16 x 16 cm) que contenía el buffer electroforesis (300 mM NaOH; 1 mM EDTA; pH > 13) dejándolos 20 minutos previo a la electroforesis. La electroforesis se realizó a 11 voltios por 40 minutos a 4 °C. Después de la electroforesis se neutralizó el gel lavando tres veces las láminas en el buffer de neutralización (0,4 M TRIS-HCl, pH: 7,4) por cinco minutos. Posteriormente, las láminas se colorearon con 80 µL de bromuro de etidio (20 µg/mL), dejándolo por 5 min y luego lavando con agua destilada para remover el exceso de colorante. La lectura se realizó en un microscopio de fluorescencia Olympus, y las fotos se capturaron con cámara digital Canon. Las lecturas de los cometas se evaluaron con ayuda del analizador de imagen IMAGE J (Helma, 2000). Se utilizaron los siguientes controles: *positivos* (peróxido de hidrógeno, 10 y 5 µM) (Tice, 2000; Lazorová, 2006; Carthy, 1997, Rodríguez, 2001), *negativos* (PBS, DMSO 10% y EtOH al 5%). Los montajes de los extractos etanólicos (disueltos en solución PBS: DMSO1:1) y acuosos (disueltos en PBS) se realizaron utilizando concentraciones desde 2000 ppm hasta 5 ppm. El parámetro que se evaluó fue la longitud de migración del ADN en µm (tabla 3).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La marcha fitoquímica de *Sida rhombifolia* L. permitió poner de manifiesto la presencia del tipo de metabolitos secundarios presentes en esta planta. Los reportes de la literatura (Karou et ál., 2005;

Tabla 3. Interpretación de la longitud de cometa

Estadios	Longitud (µm)	Interpretación
0	Hasta 24	No genotóxico
A	25-32	Ligeramente genotóxico
B	33-40	Moderadamente genotóxico
C	41-53	Altamente genotóxico
D	Mayor de 53	Extremadamente genotóxico

Karou et ál., 2003; Jang et ál., 2003; Banzouzi et ál., 2004) realizados en otras especies de *Sida* informan la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos y saponinas. En el caso del material vegetal procedente de la Sierra Nevada de Santa Marta, tanto partes aéreas como raíces dieron positivo a la presencia de alcaloides, y débilmente positivo a la de flavonoides y triterpenoides. Es de señalar que en el caso de la prueba para sapogeninas, los tallos dieron positivo a la prueba de formación de espuma, pero no a la de hemólisis, razón por la cual no se consideró como positiva.

Al realizar la cromatografía en capa delgada (ccd) el extracto etanólico de raíz y la fracción de éter de petróleo mostraron resultados positivos para terpenoides; los tallos mostraron la presencia de cardiotónicos y esteroides mientras que las fracciones de cloroformo y butanol revelaron la presencia de alcaloides.

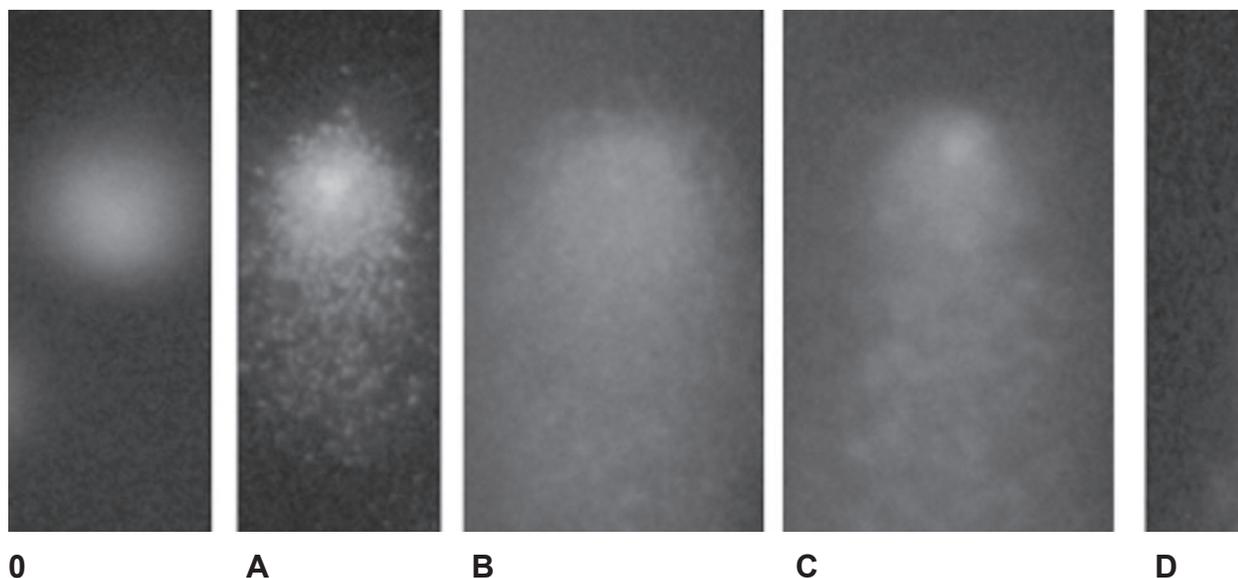


Figura 1. Ensayo Cometa: valoración cualitativa de longitud de cola.

Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos en los biomodelos: *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* y *Artemia salina*

Tipo de extracto/fracción	Parte de la planta	<i>Hydra attenuata</i>		<i>Artemia salina</i>		<i>Daphnia magna</i>	
		CL _{50-72h} (ppm)	Límites (95%)	CE _{50-24h} (ppm)	Límites (95%)	CE _{50-24h} (ppm)	Límites (95%)
Etanólico	Tallos	37,79	30,92 - 45,70	219,61	172,30 - 278,84	202,77	139,47 - 290,97
	Hojas	40,84	33,37 - 48,99	376,98	323,30 - 437,21	390,24	266,69 - 524,01
	Raíz	27,94	22,66 - 34,78	203,68	168,53 - 244,36	81,57	64,01 - 106,34
Acuoso	Tallos	348,30	324,20 - 374,77	803,85	672,89 - 1027,46	Mayor de 1000	
	Hojas	837,25	798,32 - 876,26	770,35	656,03 - 939,25	Mayor de 1000	
	Raíz	Mayor de 1000		897,11	783,59 - 1049,80	Mayor de 1000	
Fracciones partes aéreas	Éter de petróleo	43,53	34,72 - 52,66	99,66	78,19 - 124,32	44,55	36,35 - 56,77
	Acetato de etilo	23,22	19,53 - 28,45	94,11	80,96 - 111,73		
	Cloroformo	27,85	22,92 - 34,23	269,03	217,62 - 331,29		
	Butanol	69,46	58,01 - 85,18	238,41	179,52 - 319,95		
	Agua	Mayor de 1000		891,03	759,70 - 1121,26		

La evaluación de la sensibilidad de los tres organismos de prueba utilizando como control positivo dicromato de potasio en *Daphnia magna* proporcionó un valor promedio de CE_{50-24h} de 0,37 ppm; para *Hydra attenuata* CE_{50-72h} de 0,74 ppm, y para *Artemia salina* CE_{50-24h} de 8,6 ppm. En todos los casos los valores de concentraciones efectivas 50 se encuentran dentro del promedio reportado en la literatura (Lagarto et ál., 2001; EPA, 2002; ISO, 1996).

En el bioensayo con *Daphnia magna* los extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces de *S. rhombifolia* presentan en promedio mayor toxicidad que los acuosos. Dentro de los extractos etanólicos, el que mostró mayor toxicidad en este organismo de prueba fue el de raíces (CE_{50-24h} de 81,57 ppm), seguido por el de tallos (202,77 ppm) y, por último, el de hojas (390,24 ppm).

Los ensayos de toxicidad utilizando *Hydra attenuata* muestran que las fracciones de acetato de etilo (CL_{50-72h}: 23,22 ppm) y cloroformo (CL_{50-72h}: 27,85 ppm) presentaron mayor toxicidad que las fracciones de éter de petróleo (CL_{50-72h}: 43,53 ppm), butanol (CL_{50-72h}: 69,46 ppm) y acuosa (CL_{50-72h}: >1000 ppm). En cuanto a los extractos etanólicos la mayor toxicidad la presentó el de raíces (CL_{50-72h}: 27,94 ppm); seguido por el de tallos (CL_{50-72h}: 37,79 ppm) y, por último, el de hojas (CL_{50-72h}: 40,84 ppm). Los extractos acuosos fueron los menos tóxicos (tallos CL_{50-72h}: 348,30 ppm; hojas CL_{50-72h}: 837,25 y raíces CL_{50-72h}: > 1000 ppm).

Con *Artemia salina* se confirmó que la toxicidad de algunas de las fracciones fue mayor que la de los

extractos etanólicos y acuosos. Las fracciones presentaron valores de CE₅₀ que van desde 94,11 ppm para la de acetato de etilo, hasta 891,03 ppm para la acuosa. Los extractos etanólicos mostraron valores de CE_{50-24h} que oscilaron entre: 203,68 ppm (raíces) y 376,98 ppm (hojas). Los extractos acuosos en general presentaron menor toxicidad con CE_{50-24h}: entre 897,11 ppm (raíces) y 770,35 ppm (hojas).

La prueba de sensibilidad a antimicrobianos de los extractos de *Sida rhombifolia* L. frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa* mostró que los extractos etanólicos presentan actividad antimicrobiana débil frente a ambas cepas (*P. aeruginosa* y *S. aureus*). Con el *S. aureus* se evidenció la actividad antimicrobiana, mostrando halos en un rango de 7 a 12 mm, dependiendo del extracto o la fracción que se estuviera utilizando, mientras que en *Pseudomonas aeruginosa* los diámetros de halos de inhibición oscilaron entre 5 y 8 mm, que fueron evidentes solamente con los extractos etanólicos y acuosos. En *E. coli* no se observó ninguna inhibición. Sin embargo, habría que señalar que los halos de inhibición obtenidos podrían ser el resultado de la interacción de una serie de factores tales como: deficiencias en la difusión del extracto o fracción en el medio utilizado, o que la concentración de los metabolitos no sea lo suficientemente elevada para observar cambios en la sensibilidad de las cepas a medida que aumenta la concentración.

En el ensayo Cometa se evidenció la genotoxicidad de los extractos etanólicos de *Sida rhombifolia* L. por los diferentes estadios (desde el A hasta el D) que se presentaron en un rango de concentraciones entre 10 y 100 µg/mL, considerados

altamente tóxicos. El extracto que mostró mayor genotoxicidad fue el etanólico de raíz ya que a una concentración de 10 ppm presentó un estadio C, con una longitud de Cometa de 49,81 μm ; el de hojas, a una concentración de 15 ppm, presentó un estadio B (28,43 μm), y el de tallos, a una concentración de 25 ppm, un estadio B con una longitud de cometa de 31,94 μm .

Para los extractos acuosos se utilizaron concentraciones entre 100-500 $\mu\text{g/mL}$. El extracto acuoso de tallos mostró un estadio B a una concentración de 400 ppm (moderadamente tóxico), y los de hojas y raíces a concentraciones entre 500-1000 $\mu\text{g/mL}$ mostraron un estadio A (ligeramente tóxicos).

CONCLUSIONES

El análisis fitoquímico de *Sida rhombifolia* L. procedente de la Sierra Nevada de Santa Marta, tanto partes aéreas como raíces, dio positivo a la presencia de alcaloides, y débilmente positivo a la de flavonoides y triterpenoides.

La evaluación preliminar de la toxicidad utilizando como organismos de prueba *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* y *Artemia salina* puso de manifiesto que los valores de CE_{50} en dos de los tres biomodelos (*A. salina* y *H. attenuata*) corroboran que los mayores valores de toxicidad se encuentran en las fracciones y, dentro de este grupo, la que presenta mayor toxicidad es la de acetato de etilo. En el caso de los extractos etanólicos de *Sida rhombifolia* L., el de raíces es el más tóxico. Esto sugiere que se puede utilizar esta batería de bioensayos para realizar separación bioguiada y selectiva de los extractos y las fracciones para aislar los metabolitos secundarios responsables de la toxicidad.

Respecto a la prueba de sensibilidad a antimicrobianos el extracto etanólico de raíz y el extracto acuoso de hojas presentaron actividad frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; en cuanto a las fracciones, las más activas fueron: acetato de etilo y cloroformo frente a *Staphylococcus aureus*, que pudiera ser atribuida a los metabolitos secundarios (terpenoides, flavonoides) que están presentes en esta especie.

Los extractos etanólicos de *Sida rhombifolia* L. presentan una importante actividad genotóxica

sobre los linfocitos, siendo el más tóxico el extracto etanólico de raíces. Los extractos (etanólico y acuoso) de hojas presentan baja genotoxicidad, lo cual resulta importante si se toma en consideración que es la parte de la planta es utilizada como tizana por las comunidades para el tratamiento de enfermedades de la piel y digestivas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Investigación, sede Bogotá por su apoyo. Al equipo de trabajo del Instituto de Biotecnología. Al laboratorio de Principios Bioactivos en plantas medicinales, del Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Al posgrado de Maestría Interfacultades en Microbiología y al profesor Jairo Calle (q.e.p.d.).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Banzouzi, J-T.; Prado, R.; Menan, H.; Valentin, A.; Roumestan, C.; Mallié, M.; Pelissier, Y.; Blache, Y. 2004 Studies on medicinal plants of Ivory Coast: Investigation of *Sida acuta* for *in vitro* antiplasmodial activities and identification of an active constituent. *Phytomedicine* 11: 338-341.
- Barros, E. 2000. Etnobotánica de la Sierra Nevada de Santa Marta. Plantas medicinales de los Arhuacos. 1 edición, Editorial Beca de Investigación Cultural 1999, Fomcuartes, Santa Marta, pp. 11-72.
- Carthy, P. J.; Sweetman, S.; Makenna, P.; Mckelvey, P. 1997. Evaluation of Manual and Image Analysis Quantification of DNA Damage in the alkaline Comet Assay. *Mutagenesis* 12 (4): 209-214.
- Coelho de Souza, G.; Haas, A. P. S., von Poser, G. L.; Schapoval, E. E. S.; Elisabetsky, E. 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 90: 135-143.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS) 2006 M2-A9 Vol. 26, No. 1 Replaces M2-A8 Vol. 23 No. 1 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard. 9 edition. January 2006. Pennsylvania. pp. 1-12.
- CYTED. 1995. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma X. Química Fina Farmacéutica. Proyecto X-1 Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas de la Región.

- Manual de Técnicas de Investigación. Marzo 1995. Bogotá, pp. 45-49; 63-69.
- Dinan, L.; Bourne, P.; Whiting, P. 2001. Phytoecdysteroid profiles in seeds of *Sida* spp. (Malvaceae). *Phytochemical Analysis* March/April, 12(2):110-119.
- Duke, J. 1999. Chemicals and their biological activities in *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) Broomweed, Tea plant. Agricultural Research Service (ARS), United States. Department of Agriculture. Database available from: <http://www.ars-grin.gov/duke/>
- EPA. United States Environmental Protection Agency. 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition October 2002. Cincinnati, Ohio. pp 117-166.
- Harsha, V. H.; Hebbar, S. S.; Shripathi, V.; G. R. Hegde. 2003. Ethnomedicobotany of Uttara Kannada District in Karnataka, India/plants in treatment of skin diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 84: 37-40.
- Helma, C.; Uhl, M. 2000. A public domain analysis program for the single cell-electrophoresis comet assay. *Mutation Research*. 466: 9-15.
- ISO, 6341. 1996. Calidad del agua. Determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Ensayo de toxicidad aguda. Ginebra. p 1-8
- Jang, D. S.; Park, E. J.; Kang, Y-H., Su, B-N.; Hawthorne, M. E.; Vigo, J. S.; Graham, J. G.; Cabieses, F.; Fong, H. H. S.; Mehta, R. G.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. 2003. Compounds obtained from *Sida acuta* with the potential to induce quinone reductase and to inhibit 7,12-dimethylbenz-[a]anthracene-induced preneoplastic lesions in a mouse mammary organ culture model. *Archives of Pharmacol. Research*. 26 (8): 585-590.
- Karou, D.; Savadogo, A.; Canini, A.; Yameogo, S.; Montesano, C.; Simpoire, J.; Colizzi, V.; Traore, A. 2005. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology*. 4 (12): 1452-1457.
- Karou, D.; Dicko, M. H.; Sanon, S.; Simpoire, J.; Traore, A. S. 2003. Antimalarial activity of *Sida acuta* Burm. (Malvaceae) and *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 89: 291-294.
- Lagarto, P. A.; Silva, Y. R.; Guerra, S. I.; Iglesias, B. 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(5): 395-400. Disponible en: <http://www.urbanfischer.de/journals/phytomed>
- Lazarová, M.; Lábaj, J.; Eckl, P.; Slamjnov, D. 2006. Comparative evaluation of DNA damage by genotoxicants in primary rat cells applying the comet assay. *Toxicology Letters* 164: 54-62
- Monroy, C.; Cortés, A. C.; Sicard, D.; Groot, H. 2005. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica*, sep. 2005, 25(3): pp. 335-345. ISSN 0120-4157. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572005000300009&Ing=es&nr=iso. ISSN 0120-4157
- Rodríguez, G.; Cancino, L.; Prieto, E.; Espinosa, J. 2001. Tinidazol: una droga antimicrobiana con actividad genotóxica. *Revista Cubana de Investigación Biomédica* 20(1): 54-58.
- Sanabria, A. 1983. Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia *Compositae*. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. pp. 63-80.
- Tice, R. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 206-221.
- Trottier, S. 1997. Développement d'un nouveau test de dépistage des effets toxiques (sub) létaux et tératogènes avec le coelentéré *Hydra attenuata* at application sur des effluents industriels. Tesis de Maître en Environment. Faculté des Sciences. Université de Sherbrooke. Canadá.