
Análisis comparativo de la toxicidad del extracto acuoso en cocimiento de la harina de maca (*Lepidium meyenii*, Walp) en tres especies de animales modelos: Artemia franciscana (Crustácea, Anostraca), pez Guppy (*Poecilia Reticulata*) y ratón (*Mus musculus*)

COMPARATIVE ANALYSIS OF TOXICITY OF AQUEOUS BOILED EXTRACTS OF MACA FLOUR (*LEPIDIUM MEYENII* WALP) IN ARTEMIA FRANCISCANA (CRUSTACEA ANOSTRACA), GUPPY (*POECILIA RETICULATE*) AND MOUSE (*MUS MUSCULUS*)

Gutiérrez, H.¹; Gutiérrez, R.¹; Herles, E.¹; Hernández, M.¹; Horna, P.¹; Hoyos, P.¹; Huby, C.¹; Jiménez, M.¹; Jiménez, L.¹; Kollmann, A.¹; Castañeda, B.²; Ibáñez, L.³; Scotto, C.⁴

RESUMEN

Se evalúa la toxicidad del extracto acuoso en cocimiento de la harina de maca en dos organismos acuáticos, un invertebrado la Artemia franciscana y un vertebrado el pez Guppy (*Poecilia reticulata*). Así mismo, se evalúa la toxicidad aguda por vía intraperitoneal en el ratón (*Mus musculus*) que es el modelo animal comúnmente utilizado para ensayos preclínicos a nivel de laboratorios. Se comprobó que existe toxicidad del *Lepidium meyenii* para estos tres animales que dependen de la dosis y el tiempo de exposición.

PALABRAS CLAVES

Artemia, guppy, ratón, maca, toxicidad.

ABSTRACT

Toxicity of aqueous boiled extracts of maca flour was evaluated in two aquatic organisms: *Artemia franciscana* (invertebrate) and guppy (*Poecilia reticulata*), a vertebrate fish. Also, acute toxicity of this extract was evaluated by intraperitoneal administration in mouse (*Mus musculus*), a common animal model used in laboratories for preclinical tests. Results show toxic effects of *Lepidium meyenii* on all three animal species, depending on dose and exposure time.

KEY WORDS

Artemia, guppy, mouse, maca, toxicity

INTRODUCCIÓN

La maca es utilizada en medicina popular, con la creencia que, favorece la reproducción en los animales y en el hombre, pero hay pocas pruebas experimentales del mismo (Baquerizo, 1968)¹. Sin embargo, estudios sobre los posibles efectos secundarios en el organismo son inexistentes (Benavides *et al.*, 2000)².

La mayoría de estudios sobre los efectos de la maca en animales se han realizado en roedores como son las ratas, ratones y cobayos. Y estos estudios se han centrado mayormente sobre la fertilidad (Zheng, 2000³; D'Arrigo *et al.*, 2004⁴)

Los estudios sobre la toxicidad en embriones están generando nuevas perspectivas en la acción de los extractos de plantas medicinales, con la finalidad de entender la toxicidad en la gestación y primeros estadios de desarrollo embrionario. A pesar de esto, muchos estudios están incompletos y no muestran efectos significativos sobre el embrión (Del Valle & Orihuela, 1996⁵).

1 Alumno de la Fac. Med. U.S.M.P. Lima. Perú.

2 Instituto de Investigación, Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Martín de Porres, Lima – Perú.

3 Instituto de Investigación, Facultad de Medicina Humana, Universidad San Martín de Porres. Lima. Perú.

4 Mg. Cs. Blgo. Laboratorio de Investigación Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima. Perú.

El principal recurso para establecer de modo experimental la toxicidad de los compuestos químicos lo constituyen las pruebas con animales. En las pruebas de toxicidad con animales se utilizan ejemplares que permitan una experimentación relativamente asequible y cuya respuesta general a los efectos de los tóxicos sea extrapolable al hombre. Una de las pruebas más utilizadas consiste en determinar la dosis letal media para exposiciones agudas, DL 50, que es la dosis, expresada en miligramos de tóxico por kilogramo de peso del ejemplar, que administrada de una vez por vía oral a un grupo concreto de animales produce la muerte del 50% de los animales en un período de tiempo tras el tratamiento. El valor de DL50 es el más representativo de la toxicidad aguda de una sustancia, el cual se empezó a desarrollar en 1927 por J. W. Trevan y se define como: “aquella dosis que origina la muerte del 50% de los animales” (Jurado, 1989)6. Estas determinaciones pueden realizarse con algunas variantes, ya sea modificando la duración o frecuencia de la exposición, utilizando vías de entrada distintas, variando las especies de animales de experimentación, o bien manteniendo un período de observación de los efectos más prolongado (Lagarto & Vega; 1990)7. En cualquier caso los valores obtenidos, con especificación de las condiciones en que han sido determinados, constituyen los índices de toxicidad más amplios de que se dispone, pero sin que exista hasta el momento un criterio unánime al respecto al momento de utilizar un organismo determinado (CYTED, 1995) 8.

MATERIAL Y MÉTODOS

De las especies animales utilizadas

El presente estudio es un ensayo analítico experimental del efecto del extracto acuoso en cocimiento de la harina de la maca (*Lepidium meyenii*) sobre la mortalidad de tres especies de animales modelos: el invertebrado *Artemia*, y dos vertebrados el pez Guppy y el ratón doméstico.

Se trabajó en las siguientes poblaciones de animales: 108 peces alevinos de Guppy, 270 nauplios de *Artemia* y 25 ratones adultos.

De la preparación del extracto acuoso en cocimiento de la harina de maca

Se utilizó harina de maca de la marca “Amazon Nutrition Maca Powder” de la empresa Amazon Nutrition. A una concentración de 1g de harina de maca en 10 ml de agua destilada, fue hervida a 80°C en un vaso de precipitación por 10 minutos con agitación constante. Luego enfriada y filtrada con papel filtro, y almacenada en un frasco oscuro hasta su uso final.

FIGURA 1: Harina de maca envasada (Izquierda). Preparación del extracto acuoso de la harina de maca (Derecha)



Método del ensayo de toxicidad en alevines del pez Guppy

Se utilizaron alevines con menos de 3 días de nacidos, los cuales fueron mantenidos con oxigenación artificial suficiente, luz artificial, alimento seco *ad libitum* marca Sera Micron, temperatura de 25°C y en agua ssa <sssssx reposada por tres días (no destilada).

FIGURA 2: Sistema de oxigenación utilizado para realizar los ensayos con diferentes concentraciones de extracto de maca



Se prepararon soluciones acuosas de la maca a diferentes concentraciones con agua de pecera reposada por tres días:

Concentración (mg/ml)
0.05
0.5
5

En cada vial de 50 ml se agregaron 6 alevines y se trabajó con dos repeticiones por cada concentración. Después de 24 horas, se contó y anotó el número de sobrevivientes en cada dilución. Después de 48 horas, se volvió a contar y anotar el número de sobrevivientes en cada dilución. Después de 72 horas, se volvió a repetir el conteo y se anotó el número de sobrevivientes en cada dilución.

Método del ensayo de toxicidad en nauplios de *Artemia franciscana*

Se preparó agua de mar (3.8 g de sal de mar comercial en 100ml de agua destilada) y se filtró. Se colocó aproximadamente 50 mg de huevos de *Artemia franciscana* en un Erlenmeyer con 350ml de agua de mar. Se les alumbró con luz artificial o natural y se oxigenó con una bomba de oxígeno con burbujeo lento.

FIGURA 3: Preparación de las diluciones del extracto de maca en agua salina (Izquierda) y armado del sistema de oxigenación para *Artemia franciscana* (Derecha)



Se preparó la solución acuosa de maca y se disolvió en agua de mar en las siguientes concentraciones:

Concentración (mg/ml)
0.05
0.5
5

Se agregaron 10 nauplios eclosionados a cada vial que contenía la maca disuelta en agua destilada a un volumen final de 5 ml. Se trabajó con dos repeticiones por concentración. A cada vial se le agregó además una gota de suspensión de levadura (3mg de levadura seca disuelta en 5ml de agua de mar) como alimento.

Después de 24, 48 y 72 horas, se contó y anotó el número de sobrevivientes en cada dilución.

Método del ensayo de toxicidad en el ratón

La prueba se realizó, mediante la administración del extracto acuoso en cocimiento de la harina de maca por vía intraperitoneal para evitar el metabolismo hepático.

Se pesaron los animales y con tinta se les tiñó en diferentes partes del cuerpo para su futura identificación (Cabeza, Cola, Pata, Lomo, Blanco)

Se tabularon los resultados y se procedió al cálculo del volumen a administrar de la siguiente manera:

Grupo	Concentración
1	1000 mg / kg de peso del animal
2	2000 mg / kg de peso del animal
3	4000 mg / kg de peso del animal
4	8000 mg / kg de peso del animal
5	12000 mg / kg de peso del animal

GRUPO 1

Ratón	Peso (g)	Dosis (ml)
Cabeza	15.5	0.155
Cola	13	0.13
Pata	15	0.15
Lomo	15.5	0.155
Blanco	16.5	0.16

GRUPO 2

Ratón	Peso (g)	Dosis (ml)
Cabeza	13	0.26
Cola	17.5	0.35
Pata	16	0.32
Lomo	14	0.28
Blanco	15.5	0.31

GRUPO 3

Ratón	Peso (g)	Dosis (ml)
Cabeza	13.5	0.54
Cola	16	0.64
Pata	17.5	0.70
Lomo	14	0.56
Blanco	19	0.76

GRUPO 4

Ratón	Peso (g)	Dosis (ml)
Cabeza	21	1.68
Cola	21.5	1.72
Pata	22	1.76
Lomo	24	1.92
Blanco	23	1.84

GRUPO 5

Ratón	Peso (g)	Dosis (ml)
Cabeza	28	3.36
Cola	23	2.76
Pata	24	2.88
Lomo	24	2.88
Blanco	22	2.64

Una vez obtenidos los volúmenes a administrar se procedió a la administración de los animales. Se revisaron los animales cada hora por cuatro horas y después a las 24 horas.

Análisis Estadístico

El efecto de la toxicidad del extracto de la harina de la maca sobre los animales se realizó por conteo directo de los animales muertos en 24, 48 y 72 horas.

Los resultados se procesaron utilizando el paquete estadístico SPSS (Versión 10). La significancia estadística de las diferencias entre las medias será evaluada por la prueba de t de Student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TABLA 1: Resultados de tres ensayos de la toxicidad de la harina de maca (*Lepidium meyenii* Walp) en los nauplios de la *Artemia franciscana* a las 24, 48 y 72 horas

1er. Ensayo	24 Horas			48 Horas			72 Horas			Mortandad (24h)		
Concentración	Número de muertos x Frasco			Número de muertos x Frasco			Número de muertos x Frasco			M / V	% Mort.	Nº
5 mg /ml	10	10	10	-	-	-	-	-	-	30/30	100	30
0.5 mg/ml	1	4	4	-	-	-	-	-	-	9/30	30	30
0.05 mg/ml	0	1	0	-	-	-	-	-	-	1/30	3.33	30

2do. Ensayo	24 Horas			48 Horas			72 Horas			Mortandad (24h)		
Concentración	Número de muertos x Frasco			Número de muertos x Frasco			Número de muertos x Frasco			M / V	% Mort.	Nº
5 mg /ml	9	9	9	-	-	-	-	-	-	27/30	90	30
0.5 mg/ml	3	2	2	-	-	-	-	-	-	7/30	23.3	30
0.05 mg/ml	1	0	1	-	-	-	-	-	-	2/30	6.66	30

3er. Ensayo	24 Horas			48 Horas			72 Horas			Mortandad (24h)		
Concentración	Número de muertos x Frasco			Número de muertos x Frasco			Número de muertos x Frasco			M / V	% Mort.	Nº
5 mg /ml	10	10	10	-	-	-	-	-	-	30/30	100	30
0.5 mg/ml	2	3	2	3	4	3	7	8	7	7/30	23.3	30
0.05 mg/ml	1	1	1	2	3	4	5	7	8	3/30	10	30

La *Artemia franciscana* es utilizada como prueba preliminar para evaluar sustancias citotóxicas, o antitumorales, cuando dan un resultado positivo a concentraciones/dosis muy reducidas. Los resultados de la Tabla 1, sugieren que la maca pudiese tener efectos antitumorales y se debería proceder a realizar estudios sobre cultivos en células tumorales.

TABLA 2: Prueba de la toxicidad de la harina de maca (*Lepidium meyenii* Walp) en el pez guppy (*Poecilia reticulata*) a las 24, 48 y 72 horas

1er. Ensayo	24 Horas			48 Horas			72 Horas			Mortandad (72h)		
Concentración	Número de muertos x frasco			Número de muertos x frasco			Número de muertos x frasco			M / V	% Mort.	Nº
5 mg /ml	0	0	0	4	4	5	5	5	6	16/18	88.8	18
0.5 mg/ml	0	0	0	0	0	0	3	3	0	6/8	75	18
0.05 mg/ml	0	0	0	2	0	0	2	1	0	3/8	37.5	18

2do. Ensayo	24 Horas			48 Horas			72 Horas			Mortandad (72h)		
Concentración	Número de muertos x frasco			Número de muertos x frasco			Número de muertos x frasco			M / V	% Mort.	Nº
5 mg /ml	0	0	1	4	3	5	6	5	6	17/18	94.4	18
0.5 mg/ml	0	0	0	1	2	0	3	0	3	6/8	75	18
0.05 mg/ml	0	0	0	2	0	0	2	1	1	4/8	50	18

Los resultados de la Tabla 1 en *Artemia franciscana* mostraron toxicidad a las 24 horas a la mayor dosis (5 mg/ml). Mientras que en el pez guppy (Tabla 2), recién se observó citotoxicidad a un mayor tiempo (entre 48 y 72 horas). Siendo a las 72 horas, la toxicidad entre 88.8 y 94.4% para la dosis de 5mg/ml y de 75% para la dosis de 0.5mg/ml. Y entre 37.5 y 50% para la dosis de 0.05 mg/ml.

Existe una correlación positiva entre pruebas realizadas en *Artemia franciscana* y *Poecilia reticulata* (pez guppy). Sin embargo, la prueba de citotoxicidad en pez guppy no se encuentra estandarizada internacionalmente, característica que sí posee la prueba en *Artemia* y en ratón, expuesto en el manual de técnicas de CYTED (1995)⁸.

TABLA 3: Resultados de los ensayos de toxicidad de la harina de maca (*Lepidium meyenii* Walp) en el ratón adulto a las 24 horas

Único Ensayo	24 Horas			Mortandad (24h)		
Concentración (mg de solución x Kg peso animal)	Número de muertos x prueba			M / V	% Mort.	Nº
12000	5			5/5	100	5
8000	1			1/5	20	5
4000	0			0/5	0	5
2000	0			0/5	0	5
1000	0			0/5	0	5

Beltrán y colaboradores, determinaron en 1998 que la dosis letal media (DL₅₀) del *Lepidium meyenii* superó los 15000mg/kg del peso del animal (inyección intraperitoneal). En el experimento se probó una dosis máxima de 12000mg/kg de peso del animal, obteniéndose que en un grupo de 5 ratones hubo toxicidad (Tabla 3), lo cual corrobora los datos de Beltrán y colaboradores de que la maca no es tóxica debido a sus elevadas dosis para ocasionar DL₅₀.

TABLA 4: Análisis de Variancia (ANVA)

FACTOR DE VARIABILIDAD	Significancia
1. Diferencias entre los tres ensayos a las 24 horas para la mortalidad en nauplios de Artemia franciscana	n.s.
2. Diferencias entre los dos ensayos a las 72 horas para la mortalidad de alevines del pez Guppy	n.s.
3. Diferencias entre las diferentes concentraciones a las 24, 48 y 72 horas sobre la mortalidad de nauplios de la Artemia franciscana	*
4. Diferencias entre las diferentes concentraciones a las 24, 48 y 72 horas sobre la mortalidad de alevines del pez Guppy	*
5. Diferencias entre las diferentes concentraciones a las 24 horas en el Ratón	*

alfa = 0.05 (*)

En la Tabla 4, se comprobó que la toxicidad dependía del tiempo y de la dosis utilizada para los tres animales modelos.

Tanto la medicina tradicional como la investigación científica le han reportado a la maca propiedades beneficiosas a nivel reproductivo (fertilidad, sexualidad, menopausia entre otros) en el hombre y roedores (rata, ratón y cuyes) (González *et al.*, 2003⁹; Alvarez, 1993¹⁰) y propiedades nutricionales (Meza, 1995¹¹). Sin embargo, existen muy pocas investigaciones acerca de la toxicidad de la maca en organismos vivos como reporta éste estudio en animales inferiores (Artemia) y animales superiores (peces y roedores). Además, está el hecho que a pesar de no haberse encontrado mortalidad en los ratones al utilizarse altas dosis (12000 mg/Kg) fuera de los parámetros establecidos internacionalmente. Queda abierta la interrogante si los reportes de toxicidad encontrados en la Artemia y el pez guppy a través del tiempo (24 a 72 horas) no sean “extrapolables” en ratones y en humanos, quizás con un estudio más amplio (mayor número de animales) y a largo plazo (semanas y meses) nos permitan obtener algunos resultados más concluyentes.

Por otro lado, se sospecha que sea un alcaloide o pocos alcaloides los que estarían produciendo mortalidad en artemia y peces y somnolencia por depresión del sistema nervioso y posterior muerte en ratones a dosis muy altas.

CONCLUSIONES

1. Existe toxicidad del 90 al 100% de la harina de maca en Artemia franciscana a una concentración de 5mg/

ml a las 24 horas de exposición. Esta mortalidad se reduce entre el 23.3 y 30% para una concentración de 0.5mg/ml. Y entre 3.33 y 10% para una concentración del 0.05mg/ml.

2. Existe toxicidad del 88.8 al 94.4% de la harina de maca en *Poecilia reticulata* a una concentración de 5mg/ml a las 72 horas de exposición. Esta mortalidad se reduce entre el 75% para una concentración de 0.5mg/ml. Y entre 37.5 y 50% para una concentración del 0.05mg/ml. Recién a las 48 horas empezó a mostrarse mortalidad para las tres concentraciones estudiadas: 5, 0.5 y 0.025 mg/ml.

3. Según los cánones internacionales no existe toxicidad del extracto acuoso de la harina de maca (< 2000 miligramos de solución/Kg de peso del animal). Sin embargo, se observó un 100% de mortalidad de la harina de maca en *Mus musculus* cuando se inyectó intraperitonealmente el extracto de harina de maca a una concentración de 12 000 miligramos de solución/Kg de peso del animal a las 24 horas de exposición. Esta mortalidad se reduce al 20% para una concentración de 8000 miligramos de solución/Kg de peso del animal donde el resto de animales presentaron letargo a los cinco minutos de la inyección.

4. Se comprobó que existe toxicidad del *Lepidium meyenii* para estos animales en dosis y tiempo dependiente.

RECOMENDACIONES

1. Se puede utilizar al pez guppy (*Poecilia reticulata*) como bioensayo o “screening” preclínico para predecir la toxicidad de extractos vegetales de interés, debido a fácil manejo (semejante a la artemia), rapidez (resultados en menos de 72 horas), costo (menor costo que el ratón por unidad), vertebrado semejante al ratón (mayor afinidad filogenética que la artemia), y utilización de un gran número de animales para muchos ensayos por experimento (superior a 100 animales).

2. La prueba en pez guppy mostró una correlación positiva con la de artemia, por lo cual podría ser utilizado para demostrar el efecto citotóxico. Sin embargo, requiere de aceptación internacional y estandarización de protocolos de trabajo.

3. Se sugiere utilizar otros organismos acuáticos semejantes al pez guppy existentes en el mercado local: Pez Cebra (*Danio rerio*), Pez espada (*Xiphophorus helleri*) y Rana de

garras (*Xenopus laevis*) como modelos animales puesto que al ser vertebrados producen efectos más evidentes sobre el sistema nervioso y la fisiología reproductiva que la Artemia.

4. Internacionalmente para estudios *in vivo* se sugiere utilizar al menos tres especies de animales distintos para dar mayor validez de toxicidad a las pruebas biológicas con extractos de plantas. Se sugiere el trinomio: Artemia + Pez + Ratón.
5. Se recomienda llevar a cabo mas repeticiones de las pruebas realizadas, pues solamente se realizaron tres repeticiones en *Artemia franciscana*, dos en *Poecilia reticulata* y una en *Mus musculus*.
6. Se sugiere hacer más estudios de toxicidad de los alcaloides totales del *Lepidium meyenii*.
4. D´Arrigo, G; Benavides, V; Pino, J. 2004. Evaluación preliminar del efecto de *Lepidium meyenii* Walp en el desarrollo embrionario de ratón. *Revista Peruana de Biología*; 11,1: 103-106.
5. Del Valle, L.; Orihuela, P. 1996. Cleavage and development in cultured pre-implantation mouse embryos exposed to lidocaine. *Reprod. Toxicol*; 10,6:1-6.
6. Jurado, C. Toxicología Veterinaria. 2ª ed., Barcelona: Editorial Salvat. 1989.
7. Lagarto, A.; Vega, R. Manual de ensayos de toxicología alternativa. CIDEM. Cuba. 1990.
8. CYTED. Manual de Técnicas de Investigación. 1995.
9. Gonzáles, G., Córdova, A.; Vega, K. 2003. Effect of *Lepidium meyenii* (maca), a root with aphrodisiac and fertility-enhancing properties, on serum reproductive hormone levels in adult healthy men. *Journal Endocrinology*; 176: 163-168.
10. Álvarez, C. Utilización de diferentes niveles de "maca" en la fertilidad de cobayos. Tesis para optar el título de Ingeniero Zootecnista. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión. Pasco. Perú. p 102. 1993.
11. Meza, E. Efectos de la maca (*Lepidium meyenii*, Walp) sobre los parámetros productivos y reproductivos de cuyes de raza Wanka. Tesis para optar el título de ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo. Perú. p 82. 1995.

Carlos Scotto
Fac. Med. U.S.M.P

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Baquerizo, G. 1968. Estudio Químico Bromatológico de *Lepidium meyenii* Walp (maca) y de *Aiphanes var. deltoidea* Burret (Shica-Shica). Tesis. Bachiller en Medicina. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú.
2. Benavides, V.; Trujillo, G.; D´Arrigo, G.; Paredes, U; Pino, J. 2000. Evaluación toxicológica preliminar de *Ruta graveolens*, *Origanum vulgare*, y *Persea americana* sobre embriones pre implantacionales de ratón. *Revista Peruana de Biología*; 7,1:86-88.
3. Zheng, B.L. 2000. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology*; 55:598-602.