ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto protector del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown sobre la toxicidad del mercurocromo en raíces de *Allium cepa* L.

The protective effect of essential oil from *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown on the mercurochrome toxicity in roots of *Allium cepa* L.

Antonia Paola Vera^I; Jesús T. Olivero V^{II}; Beatriz E. Jaramillo ^{III}; Elena Stashenko^{IV}

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: dentro de la gran variedad de recursos de origen natural y que diversos estudios reportan propiedades medicinales, se encuentra la planta de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown; es un arbusto aromático que pertenece a la familia Verbenaceae, originaria de América tropical. Conocida en Colombia como pronto alivio. Presenta numerosas propiedades medicinales como antiespasmódica, carminativa, digestiva, diurética, expectorante, laxante, sedante, somnífera, sudorífica, antimicrobiana, antioxidante, antiulcerosa y anticonvulsivante.

OBJETIVO: se evaluó el efecto protector del aceite esencial obtenido de tallos y

¹Ingeniera en Alimentos. Grupo de Química Ambiental y Computacional, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena, Campus Zaragocilla. Cartagena, Colombia.

^{II}Químico Farmaceútico. Doctor en Química. Docente. Grupo de Química Ambiental y Computacional, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena, Campus Zaragocilla. Cartagena, Colombia.

Doctora en Química. Docente. Grupo de Investigaciones Agroquímicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Cartagena, Campus Zaragocilla. Cartagena, Colombia.

^{IV}Doctora en Química. Docente. Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Centro de Excelencia CENIVAM, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.

hojas frescas de L. alba sobre la toxicidad del mercurocromo en raíces de A. cepa. El mercurocromo a 10, 250 y 500 μ M mostró efecto tóxico sobre las células meristemáticas de A. cepa. El aceite a 100 μ M, produjo un efecto protector demostrado por la disminución de AC y aumento de la longitud y peso de las raíces expuestas a mercurocromo 10 y 500 μ M.

MÉTODOS: los parámetros evaluados fueron alteración del índice mitótico, inhibición del crecimiento radicular e inducción de aberraciones cromosómicas en ausencia y presencia del aceite esencial.

RESULTADOS: el mercurocromo a 10, 250 y 500 μ M mostró efecto tóxico sobre las células meristemáticas de *A. cepa*. El aceite a 100 μ M, produjo un efecto protector demostrado por la disminución de aberraciones cromosómicas, así como aumento de la longitud y peso de las raíces expuestas a mercurocromo 10 y 500 μ M.

CONCLUSIONES: los datos presentados en esta investigación mostraron que disminuyó la aparición de aberraciones cromósomicas y cambios morfológicos producidos por la exposición de células meristemáticas de *A. cepa* a mercurocromo, lo cual indica un efecto protector o antigenotóxico del aceite esencial de *L. alba.*

Palabras clave: aceite esencial, *Allium cepa*, células meristemáticas, crecimiento radicular, efecto protector, genotoxicidad, índice mitótico, *Lippia alba* Mill N.E. Brown, mercurocromo.

ABSTRACT

INTRODUCTION: within the great variety of natural resources and that different studies report its medicinal properties, is the *Lippia alba* (Mill) N.E. brown plant which is a aromatic bush belonging to Verbenaceae family to come from tropical America. Known in Colombia as soon relieve, it has many medicinal properties as antispasmodic, carminative, digestive, diuretic, expectorant, laxative, sedative, somniferous, sudoriferous, antimicrobial, antioxidant, antiulcerative and anticonvulsant.

OBJECTIVE: authors assessed the protective effect of essential oil obtained from stem and fresh leaves of *L. alba* on the mercurochrome toxicity on *A. cepa* roots. Mercurochrome (10, 250 and 500 μ M showed a toxic effect on the meristic cells of *A. cepa*. Oil (100 μ M) had a protective effect demonstrated by AC decrease and an increase of the length and weight of roots exposed to mercurochrome (10 and 500 μ M). **METHODS**: the parameters assessed include the mitotic rate alteration, radicular growth inhibition and chromosome induction in the absence and in the presence of essential oil.

RESULTS: mercurochrome (10, 250 and 500 μ M had a toxic effect on meristic cells from *A. cepa*. Oil (100 μ M) had a protective effect demonstrated by decrease of chromosomal aberrations, as well as an increase of length and weight of roots exposed to mercurochrome (10 and 500 μ M).

CONCLUSIONS: data showed in present research suggest that there was a decrease of chromosomal aberrations appearing due to exposition of *A. cepa* meristic cells to mercurochrome indicating a protective or anti-genotoxic effect of essential oil of *L. alba*.

Key words: essential oil, *Allium cepa*, meristic cells, radicular growth, protective effect, genotoxicity, mitotic rate, *Lippia alba* Mill N.E. Brown, mercurochrome.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo global en las últimas décadas ha estado caracterizado por un incremento en la utilización de sustancias químicas tóxicas asociadas con diferentes tipos de actividades (industrial, urbana, hospitalaria, comercial y agrícola. 1 Los bioensayos surgen como un instrumento alternativo y que complementa los tradicionales análisis químicos para la determinación de toxicidad de muestras ambientales.² Estos pueden auxiliar en la evaluación de los efectos a la salud (toxicidad humana y animal) y de los efectos ecológicos, de millares de sustancias químicas tóxicas que son introducidas por varias vías en el ambiente y permiten su aplicación en programas de monitoreo en la evaluación de la toxicidad.³ Entre ellos, los realizados con plantas presentan especies representativas de los agroecosistemas hortícolas, uno de los más empleados es la prueba con Allium cepa. 4.5 Hoy día existe una variedad de productos de uso humano que contienen como principio activo componentes tóxicos, tal es el caso del mercurocromo, nombre comercial de la merbromina y usualmente de tinturas hechas con merbromina y alcohol o agua (merbromina 2 %), la cual es una sal disódica órgano-mercúrica fluorescente, empleada en medicina por sus propiedades antisépticas hace más de 60 años. 6 Pocos son los reportes que evidencian su toxicidad, ⁶ existe la necesidad de conocer estos daños y buscar componentes naturales, como alternativas que los contrarresten. Dentro de la gran variedad de recursos de origen natural y que presenta diversos estudios reportados como propiedades antioxidantes, está el aceite esencial obtenido de la planta L. alba (Mill.) N.E. Brown; es un arbusto aromático que pertenece a la familia Verbenaceae, originaria de América tropical. Conocida en Colombia como pronto alivio, entre sus numerosas propiedades terapéuticas pueden citarse su utilidad antiespasmódica, carminativa, digestiva, diurética, expectorante, laxante, sedante, somnífera, sudorífica, antimicrobiana, antioxidante, antiulcerosa y anticonvulsivante.7-9

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto protector del aceite esencial de L. alba sobre la toxicidad del mercurocromo, al aplicar la prueba de Allium cepa, por causa de las numerosas propiedades reportadas de este aceite; además, estudios indican que este ensayo es un biomonitor adecuado tanto para el análisis de toxicidad como de genotoxicidad. 5

MÉTODOS

Se emplearon plantas superiores (*A. cepa*) como sistema biológico, en las cuales la observación de aberraciones cromosómicas constituye el principal método de análisis.

Determinación de la concentración tóxica y el efecto genotóxico del mercurocromo en meristemos de Allium cepa. Cultivo celular

Cebollas blancas (*A. cepa*) de 2,5 cm de diámetro, secas y sin formación de hojas y(o) raíz, fueron adquiridas y trasladadas al laboratorio para ser sometidas a los procesos de limpieza y adecuación correspondientes. Los bulbos fueron colocados en vasos plásticos transparentes con agua potable, iluminación directa y

temperatura entre 24 y 25 °C; se realizó cambio total del agua cada 24 h hasta culminar el período de estimulación de 72 h, se alcanzó así, meristemos radículares con longitudes entre 1,5 y 2,5 mm.

Prueba toxicológica

Obtenidas las longitudes de las raíces deseadas, se constituyeron los grupos de trabajo: control negativo (agua potable), control positivo (cadmio 22,5 µM) y mercurocromo 0,01, 0,1, 1, 10, 50, 100, 250 y 500 µM. El tóxico empleado (mercury dibromofluorescein disodium salt), se obtuvo de Sigma Aldrich, cada ensayo se hizo por triplicado, período de experimentación de 72 h y renovación total durante este período de las soluciones a evaluar.

Prueba citológica: fijación-coloración-montaje-medición

Ápices radiculares de cebolla blanca cortados 2 mm antes de la cofia, se tomaron en cada intervalo de tiempo correspondiente (24 a 72 h); estos fueron sometidos a ácido clorhídrico 1 N, durante 10 min. Los ápices fueron retirados del ácido y colocados en láminas portaobjetos donde les fue agregado a cada uno fucsina básica (10 min), se adicionó un cubreobjeto para realizar el aplastamiento mecánico llamado también *squash* y quedaron así listas las preparaciones citológicas para ser observadas. Aproximadamente 3 000 células se analizaron por grupo de tratamiento, se determinaron a su vez las fases mitóticas y las aberraciones (fragmentos puentes y cromosomas aislados).

Evaluación del efecto protector del aceite de Lippia alba

El aceite esencial de L. alba utilizado en este estudio fue suministrado por el Centro de Excelencia CENIVAM (Universidad Industrial de Santander).

Prueba toxicológica

Los grupos de trabajo fueron: control negativo (dimetil sulfóxido: DMSO), control positivo (Cadmio: Cd 22,5 μ M), soluciones de mercurocromo (10 y 500 μ M) y las mezclas de mercurocromo (10 y 500 μ M) más el aceite de *L. alba* (100 μ M).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los bioensayos son presentados como las medias \pm error estándar de la media (SEM), para un mínimo de 3 experimentos realizados por triplicado. Las medias para los marcadores evaluados en las diferentes concentraciones utilizadas se compararon mediante ANOVA, previa revisión de la normalidad y de varianza, con el empleo de Kolmogorov-Smirnov y Barlett. Para todos los casos el nivel de significación a utilizar fue p< 0,05.

RESULTADOS

Al evaluar mercurocromo a 10 y 500 μ M en relación con el índice mitótico de las raíces (Fig. 1), se encontró que tanto a las 24 como a las 72 h de exposición la concentración de 10 μ M no presentó diferencia significativa con el control negativo (DMSO); por el contrario, sí se pudo observar un efecto tóxico del mercurocromo a 500 μ M.

En la <u>figura 2</u>, la solución de mercurocromo a 500 µM no mostró aberraciones, a diferencia de la concentración 10 µM, la cual presentó diferencia significativa con el control negativo. La adición del aceite (100 µM) a mercurocromo de 10 µM, presentó diferencia significativa comparada con los valores obtenidos para esta misma concentración de mercurocromo sin el aceite, tanto a las 24 como a las 72 h de exposición.

El efecto protector del aceite esencial de L. alba sobre la toxicidad producida por el mercurocromo sobre el crecimiento de la raíz (Fig. 3), mostró que a las 24 h la concentración de 10 µM de mercurocromo no presentó diferencia significativa cuando se comparó con el DMSO, lo cual indicó ausencia del efecto tóxico del mercurocromo a esta concentración sobre el crecimiento en longitud de la raíz. Sin embargo, a las 72 h, se presentó una moderada actividad tóxica (p< 0,01). Como se puede observar en la figura 3, al adicionar el aceite se presenta una diferencia significativa al comparar los resultados obtenidos para el mercurocromo 10 µM, con aquellos obtenidos para la mezcla de mercurocromo 10 μM más el aceite 100 μM, lo cual significa un efecto protector del aceite. Para la concentración de 500 µM de mercurocromo, una diferencia significativa se observó (p< 0,001) cuando se comparó con el DMSO 0,5 %; se corroboró el efecto inhibidor del crecimiento producido por el mercurocromo como se indicó previamente en este estudio. La adición del aceite esencial de L. alba 100 µM no produjo diferencia significativa a las 24 h, cuando se compararon los resultados obtenidos por la concentración de 500 µM de mercurocromo solo con los de la mezcla de mercurocromo 500 µM más el aceite esencial; esto indica ausencia de efecto protector. Sin embargo, a las 72 h sí se presentó una diferencia significativa que permite sugerir un efecto protector importante contra la toxicidad del mercurocromo, ejercida por el aceite esencial de L. alba.

Como se puede observar, los resultados obtenidos a las 24 y 72 h de exposición de las raíces al mercurocromo, antes y después de adicionar el aceite de *L. alba*, son muy similares (Fig. 4). Lo anterior significa que el aceite no incrementa su actividad protectora a través del tiempo, en relación con el peso de la raíces, a diferencia de lo que se observó en este estudio para el caso del crecimiento en longitud de estas.

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, las alteraciones físicas como ganchos, nódulos, formación de raíces laterales, adelgazamiento y ablandamiento estas, encontradas en las raíces tratadas con mercurocromo a las concentraciones de 10, 50, 100, 250 y 500 µM, coinciden con estudios realizados en los cuales fue empleado cadmio como agente genotóxico; ¹⁰ lo anterior puede explicarse porque el cadmio puede ser acumulado por las plantas, principalmente en las raíces y hojas, lo cual produce desórdenes en su fisiología e inhibe el crecimiento y afecta su morfología, por competir bioquímicamente con metales esenciales como el Fe²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ y Ca²⁺ en la raíz, así como disminuye la concentración de clorofila hasta 60 % en las hojas. 11 Los daños presentados en el peso y la longitud de las raíces de A. cepa expuestas a diferentes concentraciones de mercurocromo a lo largo de este estudio fueron visibles a concentraciones de 10 y 500 µM, a diferencia de las raíces expuestas al control negativo (DMSO), las cuales mostraron un crecimiento y peso normal con el pasar del tiempo, de esta manera se corroboró el efecto tóxico del mercurocromo sobre su crecimiento; estos resultados permiten establecer similitudes con reportes de otros autores, quienes establecieron alteraciones con otras sustancias tóxicas en otros cultivos celulares, reflejado por un bloqueo en el crecimiento de las raíces de diferentes plantas como el género Helianthus, 12

Hordeum vulgares, ¹³ Z. mays. ¹⁴ De igual forma, Fusconi reportó resultados similares utilizando Cd como agente genotóxico, él mostró que este metal causó una inhibición en el crecimiento de las raíces de Pisum sativum, cuando observó su crecimiento en soluciones de cadmio a 250 μM, después de 24 h de tratamiento. ¹⁵

La inhibición en longitud de las raíces observadas en este estudio puede explicarse quizás por mecanismos relacionados con el funcionamiento de la membrana plasmática, y que involucran diferentes especies químicas, todas ellas de importancia en la fisiología vegetal, como el cinc (Zn²+), magnesio (Mg²+) y al calcio (Ca²+). Las bajas concentraciones de iones cinc favorecen un aumento de la autooxidación de la membrana plasmática, órgano en el cual están ubicados los principales sitios de selectividad en la adquisición de cationes y aniones, que provoca graves perturbaciones del ambiente celular; en consecuencia, dan un tránsito desordenado de elementos metálicos o metaloides, que conducen finalmente a la inactivación de enzimas específicas en la síntesis de proteínas y de ARN, 16 responsables directos del desarrollo de las raíces.

El análisis microscópico para las alteraciones cromosómicas realizado a las raíces de A. cepa, durante su exposición a las diferentes concentraciones de mercurocromo, fueron dadas durante las etapas del ciclo celular correspondientes a la metafase y anafase, lo cual indica puentes cromosómicos, cromosomas aislados y fragmentados como los daños genéticos más frecuentes; resultados que se apoyan en estudios realizados por *Lazutka* y otros. 17 Posiblemente, los daños genotóxicos identificados en el presente estudio son resultado de la generación de especies reactivas de oxígeno, durante las reacciones de reducción y oxidación que sufren los metales pesados en el interior de las células y por la interferencia en los procesos de reparación y replicación del ADN. 18 Una vez incorporados estos metales a los tejidos, se bioacumulan y son capaces de reaccionar con moléculas orgánicas, que presenten en su estructuras grupos sulfhidrílos y, en menor medida, radicales amino, fosfato, carboxilo, imidazol e hidroxilo, los cuales están presentes en enzimas, proteínas esenciales y ácidos nucleicos. 19 Los resultados expuestos sugieren que el aceite esencial de Lippia alba ejerce un efecto protector sobre la disminución en la presencia de aberraciones cromosómicas, peso y longitud de las raíces de Allium cepa expuestas a mercurocromo 10 y 500 μM y a Cd a 22,5 μM.

El aceite de L. alba a la concentración de 100 μ M, no produjo alteraciones sobre las células meristemáticas de A. cepa, a pesar de que para la carvona, componente principal del aceite, se ha reportado efecto mutagénico débil en la prueba de Ames. Por el contrario, disminuyó la aparición de aberraciones cromósomicas (puentes cromosómicos, cromosomas fragmentados y aislados) y cambios morfológicos (adelgazamiento de las raíces) producidos por la exposición de células meristemáticas de A. cepa a mercurocromo 10 μ M, lo que indica un efecto protector o antigenotóxico del aceite de L. alba.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Cartagena, CENIVAM-Universidad Industrial de Santander, COLCIENCIAS.

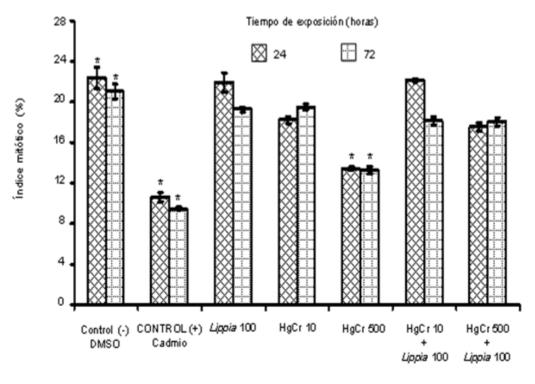
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Ronco A, Gagnon P, Díaz M, Arkhipchuk V. Overview of results from the watertox intercalibration and environmental testing phase II program: P.1; Statistical analysis of blind simple testing. J Environm Toxicol. 2002;17:232-40.
- 2. Arkhipchuk V, Garanko N. A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity. J Environ Toxicol. 2002;17:187-94.
- 3. CETESB. Bioensaios Microbianos Aplicados no Controle de Contaminantes Tóxicos Ambientais. Serie Didáctica, PROCOP; 1991. p. 1-75.
- 4. Turkoglu S. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium* cepa. Food Chem Toxicol. 2008;46:2035-41.
- 5. Yi H, Wu L, Jiang L. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay. Science Total Environ. 2007; 383: 232-6.
- 6. Ayala J, Nieto C, Santana C, Urbón A, Gracias R. Accidental oral mercurochrome poisoning. Anales de Pediatría. 2000;52:479-81.
- 7. Stashenko E, Jaramillo B, Martínez J. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of Lippia alba (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. J Chromatogr A. 2004; 1025: 93-103.
- 8. Stashenko E, Jaramillo B, Martínez J. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. Rev Acad Colomb Cienc. 2003;27(105):579-97.
- 9. Pascal M, Slowing K, Carretero E, Sánchez D, Villar A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. J Ethnoparmacol. 2001;76:201-14.
- 10. Wojcik M, Tukendorf A. Cd-tolerance of maize, rye and wheat seedlings. Acta Physiol Plant. 1999; 21: 99-107.
- 11. Zoghlami L, Djebali W, Chaib W, Ghorbel M. Modification physiologiques et struc-turales induites par l'interaction cadmium-calcium chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*). C R Biologies. 2006;329:702-71.
- 12. Chakravarty B, Srivastava S. Toxicity of some heavy metals *in vivo* and *in vitro* in amsira. Mutation Res. 1992;283:287-94.
- 13. Zhang Y, Yang X. The toxic effects of cadmium on celldivision and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare*. Mutation Res. 1994;312:121-6.
- 14. Andrade L, Campos J, Davide L. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. Ecotoxicol Environ Saf. 2008;71:706-10.
- 15. Fusconi A, Repetto O, Bona E, Massa N, Gallo C, Dumas-Gaudot E, et al. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of Pisum sativum L. cv Frisson seedlings. Environ Exp Botany. 2006;58:253-60.
- 16. WHO. "Methylmercury". Environmental Health Criteria 101. Geneva, Switzerland: Word Health Organization; 1990.

- 17. Lazutka J, Stapulionyte A, Bjerketvedt D, Odland A. Seasonal variation in the frequency of abnormal anaphases and mitotic index values in wild populations of herb-Paris (*Paris quadrifolia* L., Trilliaceae): implications for genetic monitoring. Mut Research. 2003;534:113-22.
- 18. Hartwig A. Current aspects in metal Genotoxicity. Biometals. 1995;8:3-11.
- 19. Carrascal M, Cano M, Ramos V, Arenas C. Contenidos en As, Cd, Pb, Cu y Zn en músculo e hígado de liebres (*Lepus europaea*) capturadas en el corredor verde del guardiamar. Rev Toxicicol. 2005;22(1):19-25.

Recibido: 27 de octubre de 2009. Aprobado: 30 de enero de 2010.

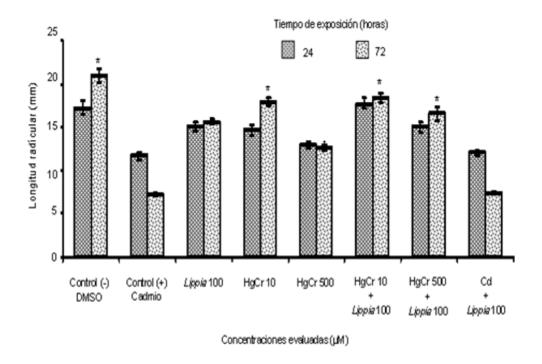
Ing. Antonia Paola Vera Ospina. Grupo de Química Ambiental y Computacional, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena, Campus Zaragocilla. Cartagena, Colombia. Correo electrónico: beatrizjaramilloc@yahoo.com



Concentraciones evaluadas (µM)

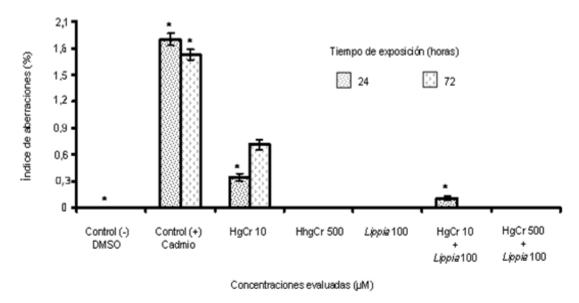
Fig. 1. Efecto del mercurocromo en ausencia y presencia del aceite esencial de *L. alba* sobre el índice mitótico en raíces de cebolla durante las 24 y 72 h de exposición. El control negativo corresponde a una solución de dimetil sulfóxido (DMSO) y el positivo a una solución de cadmio (Cd) 22,5 μM.

^{*}Diferencia significativa entre el control negativo y mercurocromo a 500 μΜ.



*Diferencias significativas correspondientes al control negativo y mercurocromo 10 μM; además de la mercurocromo 10 μM más *Lippi*a 100 μΜ.

Fig. 2. Efecto del mercurocromo en ausencia y presencia del aceite esencial de *L. alba* sobre el índice de aberraciones en raíces de cebolla durante las 24 y 72 h de exposición. El control negativo corresponde a una solución de dimetil sulfóxido (DMSO) y el positivo a una solución de cadmio (Cd) 22,5 μM.



^{*}Diferencias significativas entre el control negativo y mercurocromo 10 y 500 µM; además de las mezclas de mercurocromo 10 y 500 µM más el aceite de Lippia 100 µM a las 72 h de exposición.

Fig. 3. Efecto del mercurocromo en ausencia y presencia del aceite esencial de *L. alba* sobre la longitud en raíces de cebolla durante las 24 y 72 h de exposición. El control negativo corresponde a una solución de dimetil sulfóxido (DMSO) y el positivo a una solución de cadmio (Cd) 22,5 μM.