

## Artículos Originales

CENTRO DE INVESTIGACIONES Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS

# ESTUDIO GENOTÓXICO *IN VITRO* E *IN VIVO* EN TINTURAS DE *Melissa officinalis* L. (TORONJIL) Y *Mentha piperita* L. (TORONJIL DE MENTA)

Lic. Angel Vizoso Parra,<sup>1</sup> Lic. Alberto Ramos Ruiz,<sup>2</sup> Dra. Aida Villaescusa González,<sup>1</sup> Dra. Mercedes Decalo Michelena<sup>3</sup> y Dr. José Betancourt Badell<sup>4</sup>

## RESUMEN

Se emplearon 2 sistema de ensayo de genotoxicidad: uno *in vitro*, la prueba de segregación mitótica en el hongo diploide *Aspergillus nidulans* D-30 y otro *in vivo*, el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón. Se evaluó la posible acción de daño genético de las tinturas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Mentha piperita* L. (toronjil de menta). En el ensayo de segregación mitótica se evaluaron las tinturas de toronjil y toronjil de menta con 4 y 6 concentraciones, respectivamente, en un rango de 0,037 a 0,298 y 0,025 a 0,250 mg de sólidos totales/mL, respectivamente. En el ensayo de inducción de micronúcleos se probaron para el toronjil, dosis de 89,53; 179,06 y 358,11 mg/Kg de peso corporal y en el caso del toronjil de menta, dosis de 64,00; 128,00 y 225,00 mg/Kg de peso corporal. En ninguna de las pruebas realizadas se detectó daño citotóxico significativo, ni la ocurrencia de efectos genotóxicos.

Descriptores DeCS: *Melissa officinalis* L.; *Mentha piperita* L.; *Aspergillus nidulans*; MICRONUCLEOS; GENOTOXICIDAD; SEGREGACION MITOTICA; MEDULA OSEA; RATONES

## ABSTRACT

Two assay systems of genotoxicity were used: one *in vitro*, mitotic segregation test in *Aspergillus nidulans* D-30 diploid fungus, and another *in vivo*, micronuclei induction assay in bone marrow of the mouse. Potential action of genetic damage of tinctures from *Melissa officinalis* L. (lemon balm) and *Mentha piperita* L. (mint lemon balm) was assessed. In mitotic segregation assay, tinctures from Lemon Balm and mint lemon balm, with 4 and 6 concentrations, respectively, were evaluated within a range from 0,037 to 0,298 and from 0,025 to 0,250 mg of total solids, respectively. In micronuclei induction assay for lemon balm, dose of 89,53; 179,06, and 358,11 mg/Kg boy weight, and for mint lemon balm dose of 64,00; 128,00, and 225,00 mg/Kg body weight, were tested. In none of tests carried out a significant cytotoxic damage, neither occurrence of genotoxic effects, were detected.

Subject headings: *Melissa officinalis* L.; *Mentha piperita* L.; *Aspergillus nidulans*; MICRONUCLEI; GENOTOXICITY; MITOTIC SEGREGATION; BONE MARROW; MICE

<sup>1</sup> Licenciado (a) en Ciencias Biológicas. Investigador (a) Agregado (a). CIDEM.

<sup>2</sup> Licenciado en Bioquímica. Investigador Agregado.

<sup>3</sup> Doctora en Medicina. Especialista de I Grado en Microbiología. Hospital "Luis Díaz Soto".

<sup>4</sup> Doctor en Medicina. Profesor Asistente. Facultad de Medicina "Dr. Salvador Allende".

Los estudios de genotoxicidad constituyen un paso importante en la evaluación toxicológica de los medicamentos de origen vegetal, éstos son mezclas complejas con una o más acciones terapéuticas, donde pueden también estar presentes compuestos mutágenos relacionados con el desarrollo de procesos carcinogénicos, teratogénicos y alteraciones genéticas en la descendencia. Dentro de nuestro Plan de Investigaciones de Fitofármacos se procedió a evaluar el posible efecto genotóxico de las tinturas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Mentha piperita* L. (toronjil de menta).

La especie *Melissa officinalis* L., conocida como toronjil, hierba limón, té de Francia, etcétera es una planta medicinal que a partir de su follaje se prepara una tintura con propiedades farmacológicas reconocidas como: dermatológica, digestiva, antiviral, sedativa, bacteriostática y efecto antihormonal del extracto sobre la función pituitaria - tiroidea en ratas bajo exposición aguda y crónica.<sup>1-5</sup> Popularmente se le atribuyen efectos estimulante, cardiotónico, antiemético, etcétera; la industria la utiliza para la fabricación de licores y perfumería, ya que esta planta es rica en aceites esenciales.<sup>1</sup>

La *Mentha piperita* L. es una planta medicinal, a la cual se le atribuyen propiedades farmacológicas como: antiespasmódica y antiséptica, entre otras.<sup>6,7</sup> La población la emplea como estimulante, estomáquica, carminativa y para los mareos y vómitos.<sup>8</sup>

Los ensayos genotóxicos se iniciaron con el hongo *Aspergillus nidulans* D-30 (diploide), prueba *in vitro* que detecta, de forma rápida y sencilla, el daño genético inducido al nivel cromosómico como aneuploidía, recombinación mitótica y determinados tipos de aberraciones estructurales.<sup>9</sup>

Para realizar adecuada evaluación genotóxica de estas tinturas se procedió a evaluarlas con un ensayo *in vitro*; se seleccionó la prueba de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón, ensayo validado internacionalmente, éste detecta la ocurrencia de aberraciones cromosómicas en eritroblastos expuestos a agentes que ocasionan clatogénesis y aneuploidía. Este ensayo *in vivo* tiene el objetivo de que propiedades metabólicas y toxicocinéticas estuvieran en condiciones semejantes al hombre.<sup>10</sup>

El presente trabajo se propone determinar el posible efecto citotóxico y genotóxico de 2 tinturas de plantas medicinales, éstas se evalúan mediante 2 sistemas de ensayo a corto plazo: inducción de segregación mitótica en el hongo *Aspergillus nidulans* D-30 y el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón.

## MÉTODOS

### MATERIAL VEGETAL

El toronjil y el toronjil de menta se recolectaron en la Estación Experimental de Plantas Medicinales "Dr. Juan Tomás Roig", Güira de Melena, La Habana, en 1993, las cuales corresponden a un número de herbario Roig 4586 y Roig 4950, respectivamente. Las tinturas se elaboraron a partir del follaje de las plantas, en la Empresa Laboratorio Farmacéutico "Saúl Delgado".

En el caso del toronjil, la muestra provenía del lote 2/93, cuyas características físico-químicas fueron: sólidos totales 3,72 %; pH 6,3; índice de refracción 1,337; densidad relativa 0,9062 y etanol 64,55 %. Respecto al toronjil de menta, se empleó en los ensayos tintura del lote 2/93, con la caracterización: sólidos totales 2,55 %; pH 6,3; índice de refracción 1,364; densidad relativa 0,9001 y etanol 65,60 %.<sup>11</sup>

### ENSAYO DE SEGREGACIÓN SOMÁTICA

Se empleó la cepa *Aspergillus nidulans* D-30,<sup>12</sup> la cual tiene 4 mutaciones recesivas para el color de los conidios. Esta cepa fue sintetizada por medio del ciclo paraxenial, se emplearon las cepas haploides A 593(a) y A 594(b) procedente del Fungal Genetic Stock Center (FGSC) en Atlanta, USA. El medio de cultivo empleado fue medio completo (MC).<sup>13</sup>

Los ensayos de toxicidad y genotoxicidad se ejecutaron por el método de incorporación de placas.<sup>14</sup> Las tinturas de las plantas se añadieron al medio completo líquido a 45 °C. Se prepararon grupos de 14 placas para cada dosis y 4 placas se inocularon en punto al centro con conidios de la cepa diploide D-30 para evaluar la toxicidad cuantitativa después de 72 h de incubación a 37 °C.

El índice de citotoxicidad (IT), expresado como porcentaje de reducción del diámetro de las colonias con respecto al control negativo (solvente) se determinó transcurrido ese tiempo. Para evaluar la genotoxicidad, las placas restantes con MC se inocularon en 5 puntos equidistantes y se incubaron a 30 °C durante 6-10 días, contando los sectores segregantes coloreados, aparecidos en las colonias. La frecuencia de sectores por colonias (FSC) determina los procesos genotóxicos que conducen a la segregación somática.<sup>15</sup>

Se ensayaron concentraciones en miligramos de sólidos totales/mL de MC, hasta 0,298 (toronjil) y 0,250 (toronjil de menta), porque a partir de esos valores se producen cambios morfológicos en la conidiación y color

de los conidios (apariciencia algodonosa), que pueden impedir un correcto recuento de los sectores segregantes.

El control negativo empleado fue etanol al 64,55 y 65,60 %, a la concentración final presente en las dosis máximas de las tinturas estudiadas; 0,52 y 0,65 % (v/v) para el toronjil y el toronjil de menta, respectivamente. El control positivo utilizado fue el hidrato de cloral en una concentración de 6 mM.

Para el análisis estadístico, los datos primarios se normalizaron mediante la transformación  $(x + 0,5)^{1/2}$  a los sectores segregantes presentes en cada colonia analizada, posteriormente se le aplicó un ANOVA de una vía.<sup>16</sup>

## ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

Se emplearon ratones albinos de la línea no isogénica suizo procedentes del Laboratorio de Control Biológico del CIDEM, con un peso promedio para el toronjil de  $30,43 \pm 2,60$  y para el toronjil de menta de  $31,70 \pm 3,80$ , entre 8 y 10 semanas de nacido.

Previo al experimento, los animales se sometieron a un período de adaptación de una semana en condiciones de humedad y temperatura convencionales. La alimentación consistió en ración peletizada y agua sin restricción.

Se preparó un esquema de trabajo de 6 grupos de 10 animales (5 machos y 5 hembras) un control negativo (solvente), un control espontáneo, un control positivo y 3 dosis.

Los animales se escogieron al azar, los grupos fueron separados en jaulas independientes. La administración de las tinturas se realizó por vía oral, como lo indica su uso terapéutico, en un volumen equivalente a 1 % de su peso corporal, tanto para el toronjil como el toronjil de menta. Las dosis se seleccionaron sobre la base de la  $LD_{50}$  (dosis letal media) de los fitofármacos, lo que corresponde un valor de 716,21 mg/Kg de peso corporal y de 364,00 mg/kg de peso corporal para el toronjil y el toronjil de menta, respectivamente (Tillán J. Laboratorio de Control Biológico del CIDEM, comunicación personal) y como máximo, una dosis equivalente al 80 - 50 % de la  $LD_{50}$ .<sup>17</sup> El resto de las dosis correspondieron al 50 y 25 % de la dosis máxima.

Para que el contenido de etanol no provocara muerte en los animales se estableció un límite que no excediera de 4,74 g/kg de peso corporal, si se tiene en cuenta que la  $LD_{50}$  para el etanol en nuestras condiciones experimentales fue de 7,8 g/Kg de peso corporal.

El esquema de tratamiento consistió en 2 administraciones separadas por un intervalo de 24 h y sacrificio por dislocación cervical 24 h después del último tratamiento.<sup>18</sup>

Las muestras de médula ósea se recogieron en suero bovino fetal libre de calostro,<sup>19</sup> se fijaron con etanol al 95 % (v/v) durante 5 min y se secaron al aire por 24 h. Finalmente se tiñeron con solución Giemsa al 5 % (v/v) en agua corriente durante 20 min. Se contabilizaron 1 000 eritrocitos policromados (PCE) por animal y además, los eritrocitos normocromados (NCE) por cada 250 PCE, para calcular el IT expresado por la relación PCE/NCE. Los micronúcleos (MN) se identificaron de acuerdo con el criterio establecido por The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test.<sup>19</sup>

Como control negativo se empleó el etanol al 64,55 y 65,60%, como control positivo se empleó ciclofosfamida 20 mg/Kg de peso corporal.

Para la evaluación estadística, los valores de la relación PCE/NCE y el porcentaje de eritrocitos policromáticos micronucleados (% mPCE) se normalizaron mediante la transformación  $\sqrt{(x + 1)}$ . Los valores transformados se procesaron mediante un ANOVA de 2 vías, si se tiene en cuenta el sexo y las dosis ensayadas.<sup>20</sup>

## RESULTADOS

### SEGREGACIÓN SOMÁTICA

#### EN *Aspergillus nidulans* D-30

La tabla 1 muestra los resultados de las tinturas estudiadas; tanto para el toronjil como el toronjil de menta no se observa una toxicidad cuantitativa apreciable en el rango de las concentraciones analizadas, ni tampoco se observó efecto genotóxico significativo al realizarle un análisis de varianza simple a las FSC comparada con el control negativo para todas las concentraciones ensayadas.

### ENSAYO DE INDUCCIÓN

#### DE MICRONÚCLEO

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de inducción de micronúcleos para las 2 tinturas. Como se puede observar, para el IT no se encontraron diferencias significativas en relación con el sexo ( $p = 0,86$ ) e interacción sexo - dosis ( $p = 0,88$ ) para el toronjil. Tampoco para el toronjil de menta se detectaron diferencias significativas en relación con las dosis ( $p = 0,24$ ), sexo ( $p = 0,96$ ) ni para la interacción sexo - dosis ( $p = 0,81$ ).

Para el porcentaje de mPCE, indicador del efecto genotóxico, en el caso del toronjil, no se observaron diferencias significativas en cuanto al sexo ( $p = 0,39$ ),

dosis ( $p = 0,85$ ) ni para la interacción sexo - dosis ( $p = 0,75$ ). En relación con el toronjil de menta tampoco se evidenciaron diferencias en cuanto al sexo ( $p = 0,19$ ), dosis ( $p = 0,42$ ) ni para la interacción sexo - dosis ( $p = 0,89$ ).

No se encontraron diferencias significativas entre el control negativo y el espontáneo, en relación con los

valores del IT y el porcentaje de mPCE. También se demuestra que el etanol administrado como control negativo no afecta el parámetro que indica daño genético (% mPCE), ya que los valores obtenidos para la frecuencia espontánea se encuentran entre los valores reportados por 15 laboratorios (0,12- 0,49 %) en un estudio de Internal Program of Chemical Safety (IPCS).<sup>21</sup>

**TABLA 1.** Resultados del ensayo de inducción de segregación somática en *Aspergillus nidulans* D-30

Concentración (mg/mL)	Toxicidad			Genotoxicidad			
	Colonias analizadas	Diámetro <sup>d</sup> (mm)	IT <sup>b</sup> (%)	Colonias analizadas	Sectores segregantes	FSC	ISMI <sup>d</sup>
<b>Toronjil</b>							
Etanol <sup>e</sup> (0,52%)	7	45,2	-	100	79	0,79	1,00
0,037	7	47,2	-5,09	100	40	0,40	0,51
0,111	7	46,9	-3,76	100	53	0,53	0,67
0,186	7	48,2	-2,71	100	63	0,63	0,80
0,298	7	45,1	0,22	100	56	0,56	0,71
<b>Toronjil de menta</b>							
Etanol <sup>e</sup> (0,65%)	8	39,6	-	100	47	0,47	1,00
0,025	8	39,1	1,26	96	50	0,52	1,11
0,050	8	38,6	2,67	100	56	0,56	1,19
0,100	8	38,5	2,85	100	52	0,52	1,00
0,150	8	38,6	2,67	95	28	0,61	1,30
0,200	8	39,1	1,26	100	39	0,39	0,83
0,250	8	39,1	-0,38	100	43	0,43	0,91
<b>Hidrato de cloral<sup>f</sup> 6mM</b>	8	12,2	69,24	100	218	2,18*	4,47*

<sup>a</sup>Diámetro de las colonias a las 72 h de incubación a 37°C. <sup>b</sup>Índice de toxicidad, reducción del diámetro de las colonias respecto al control negativo. <sup>c</sup>Frecuencia de sectores por colonias. <sup>d</sup>Índice de segregación mitótica inducida, razón de incremento de la FSC respecto al control negativo. <sup>e</sup>Control negativo. <sup>f</sup>Control positivo: \* $p < 0,01$

**TABLA 2.** Resultados del ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón

Dosis	Animales	IT <sup>a</sup> ± DE	PCE analizados	mPCE <sup>b</sup>	%mPCE±DE
Etanol <sup>c</sup> (4,74 mg/kg)	10	1,45±0,13	10 220	19	0,19±0,06
Toronjil (mg/kg)					
89,53	10	1,39±0,24	10 240	19	0,19±0,05
179,06	10	1,45±0,32	10 280	19	0,18±0,08
358,11	10	1,50±0,36	10 320	17	0,16±0,05
Agua destilada <sup>d</sup>	10	1,48±0,04	10 200	18	0,17±0,09
Etanol <sup>c</sup> (4,74 mg/kg)	10	1,27±0,33	10 207	24	0,24±0,11
Toronjil de menta (mg/kg)					
64,00	10	1,21±0,43	10 348	21	0,20±0,11
128,00	10	1,16±0,75	10 084	14	0,14±0,12
225,00	10	1,00±0,23	10 128	22	0,22±0,14
Agua destilada <sup>d</sup>	10	1,29±0,55	10 125	28	0,28±0,24
Ciclofosfamida <sup>e</sup> (20 mg/kg)	10	0,44±0,22*	10 284	88	0,86±0,48*

<sup>a</sup>Índice de citotoxicidad (relación PCE/NCE). <sup>b</sup>PCE microucleados. <sup>c</sup>Control negativo. <sup>d</sup>Control espontáneo. <sup>e</sup>Control positivo: \*p<0,01.

## DISCUSIÓN

En relación con la citotoxicidad, en el ensayo de segregación somática, en valores superiores de las concentraciones ensayadas se observaron alteraciones morfológicas y de conidiación en el botón central de las colonias (aspecto algodonoso de color blanco), por lo que impedía la visualización de los sectores de color segregados. Estos efectos citotóxicos que se observan en concentraciones superiores a las establecidas pueden deberse, entre otros factores no ligados a daños del genoma celular, a las acciones sobre el complejo proceso bioquímico del ciclo celular (síntesis de proteína que actúa sobre el proceso de formación de la membrana, pared celular, etcétera) que provocan un efecto fungicida o fungiestático de los productos estudiados. La concentración de etanol en que se trabajó (0,52 % para el toronjil y 0,65 % para el toronjil de menta) se encuentran dentro de los valores permitidos para este tipo de ensayo, pues se reporta que puede emplearse

hasta concentraciones de 2 % en el método de incorporación en placa.<sup>22</sup>

La ausencia de genotoxicidad *in vitro* de las tinturas ensayadas demuestran que estos fitofármacos no contienen genotoxinas en concentraciones tales que alteren la maquinaria genética en este tipo de ensayo, o que estén presentes sustancias antimutagénicas (clorofila, carotenoide, etcétera) que inhiben o debilitan la acción directa de las genotoxinas.<sup>23</sup>

Por los resultados negativos obtenidos en el ensayo *in vitro*, el cual es más sensible que la prueba de inducción de micronúcleos *in vivo*, era de esperarse la ausencia de genotoxicidad en esta última, como efectivamente se comprobó.

Para confirmar estos resultados se reporta un efecto negativo en el ensayo de Ames, al emplear las cepas de *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 y TA 1535, con activación metabólica y sin ella para el toronjil de menta.<sup>24</sup>

## CONCLUSIONES

En las condiciones de ensayo descritas, las tinturas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Mentha piperita* L. (toronjil de menta) no presentaron acción genotóxica, ya que:

1. No indujo un incremento significativo en la frecuencia de sectores por colonias en la cepa *Aspergillus nidulans* D-30.
2. No se observó un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Plantas Medicinales. FITOMED. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 1991:102-3.
2. Kumel B, Stoll L, Brendel M. Herpes simplex: therapy with prescription free topicals. Dtsch Apoth Ztg 1991;131:1609-14.
3. Koch H, Schulze W. *Melisa officinalis* L. old plant drug with new therapeutical effects. Dtsch Apoth Ztg 1984;124:2135-145.
4. Sourgen H, Winterhoff H, Gumbiger HG, Kamper FH. Anti-hormonal effects of plants extracts : TSH and prolactin suppressing properties of *Lithospermum officinalis* L. and other plants. Plant Med 1982;45:78-86.
5. Reynolds J, Martindale EF. The extra pharmacopoeia. London: The Pharmaceutical Press, 1982:678.
6. Giachetti O, Taddei E, Taddei I. Pharmacological activity of *Mentha piperita* L., *Salvia officinalis* and *Rosmarinus officinalis* essences on oddis sphincter. Plant Med 1986;6:43-4.
7. Ross SA, El-Keliawi NE, Megalla SE. Antimicrobial activity of some egyptian aromatic plants. Fitoterapia 1980;51:201-5.
8. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba. La Habana: Editorial Ciencia y Técnica, 1988:882-3.
9. Käfer E, Scott BR, Kappas A. Systems and results of test for chemical induction of mitotic malsegregation and aneuploidy in *Aspergillus nidulans*. Mutat Res 1986;167:9-34.
10. Garriott ML, Piper CE, Kokino AJ. A simplified protocol for the mouse bone marrow micronucleus assay. J App Toxicol 1988;8:141.
11. Soler B, Méndez G, García M, Miranda M. Normas Ramales. Medicamentos de origen vegetal. Tinturas y extractos fluidos. Ciudad de La Habana: Ministerio de Salud Pública, 1992:1-13.
12. Käfer E. Test which distinguish induced crossin-over and aneuploidy from secondary segregation in *Aspergillus* treated with chloral hydrate and gamma rays. Mutat Res 1986;164:145-66.
13. Scott BR, Käfer E. *Aspergillus nidulans* : An organisms for detecting a range of genetic damage. En: Serris FJ de, Hollander A eds. Chemicals mutagens. Principle and methods for their detection. New York: Plenum, 1982:447-9.
14. Torre RA de la, Rúa R de la, Hernández G et al. Genotoxic effects of niclosamide in *Aspergillus nidulans*. Mutat Res 1989;222:337-41.
15. Ramos RA, Torres R de la, Alonso N, Villaescusa A, Betancourt J, Vizoso A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. J Ethnopharmacol 1996;52:123-7.
16. Sigarrosa A. Biometría y diseño experimental. La Habana: Ministerio de Educación Superior, 1985:276-337.
17. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present and future. Environ Mol Mutagens 1991;18:277-91.
18. Schmid W. The micronuclei test for cytogenetic analysis. En : Hollander A. Chemical mutagens. Principle and methods for their detection. New York: Plenum, 1976:31-53.
19. The Collaborative Study Groups for the Micronucleus test. Sex difference in the Micronucleus test. Mutat Res 1986;172:151-63.
20. Lovell DP, Albanese R, Clare G et al. Statistical analysis of *in vivo* cytogenetic assays. En: Kirland DJ. Editorial statistical evaluation of mutagenicity test data. Cambridge : Cambridge University Press, 1989:184-230.
21. Mac Gregor JT, Heddle JA, Hite M et al. Guidelines for the conduct of micronuclei assays in mammalian bone marrow erythrocytes. Mutat Res 1987;169:103-12.
22. Kappas A. On the Mechanisms of induce aneuploidy in *Aspergillus nidulans* and validation of test for genomic mutation. En: Mechanisms of chromosomal distribution and aneuploidy, 1989:377-84.
23. Vinitketkumnuen U, Puatanachokchae R, Kongtawelert P et al. Antimutagenicity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Staff) to various known mutagens in Salmonella mutation assay. Mutat Res 1994;341:75.
24. Andersen PH, Jensen NJ. Mutagenic investigation of peppermint oil in the Salmonella / mammalian - microsome test. Mutat Res 1984;138:17-20.

Recibido: 20 de febrero de 1997. Aprobado: 21 de febrero de 1997.  
Lic. Angel Vizoso Parra. Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos. Avenida 26 No. 1605, Plaza, Ciudad de La Habana, Cuba.